

Analyse der Induktion der generellen Stressantwort  
von *Bacillus subtilis*  
während des Wachstums bei niedriger Temperatur  
- Charakterisierung der Interaktionen  
von RsbW mit SigB und RsbV

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von  
Andrea Krisp  
aus Wolfenbüttel

Marburg/Lahn 2002

Vom Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am \_\_\_\_\_ angenommen.

Erstgutachter \_\_\_\_\_ PD Dr. Uwe Völker  
Zweitgutachter \_\_\_\_\_ Prof. Dr. Erhard Bremer  
Tag der mündlichen Prüfung am \_\_\_\_\_ 09.07.2002

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungen</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1	Aufbau des <i>sigB</i> -Operons	6
2.2	Regulation der SigB-Aktivität	7
2.2.1.	Aktivierung von SigB nach Umweltstress	8
2.2.2.	Aktivierung von SigB nach metabolischem Stress	10
2.3.	Funktion der generellen Stressantwort in <i>B. subtilis</i>	12
2.4.	Verbreitung von SigB innerhalb der Eubakteria	12
2.5	Einleitung der Sporulation durch Aktivierung von SigF	13
2.6.	Regulation von SigF durch Phosphorylierung von SpoIIAA und die Komplexierung von SpoIIAB in langlebige Intermediate	15
2.7.	Zielstellung	17
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1.	Materialien	18
3.1.1.	Geräte und Hilfsmittel	18
3.1.2.	Software	19
3.1.3.	DNA-Marker	19
3.1.4.	Proteinstandards	19
3.1.5.	Kits	20
3.1.6.	Enzyme	20
3.1.7.	Verwendete Substanzen	20
3.1.8.	Bakterienstämme	22
3.1.9.	Plasmide	24
3.1.10	Oligonukleotide	25
3.2.	Methoden	25
3.2.1.	Medien und Wachstumsbedingungen	25
3.2.1.1.	Sterilisation	25
3.2.1.2.	Vollmedien	25
3.2.1.3.	Minimalmedien	26
3.2.1.4.	Stammhaltung	26
3.2.1.5.	Medienzusätze und deren Konzentrationen	27
3.2.1.6.	Wachstum, Kultivierungs- und Stressbedingungen	27
3.2.1.7.	Wachstum in der Kälte	27

3.2.1.8.	Stabilitätsuntersuchungen in der Kälte	28
3.2.1.9.	Ernte und Aufschluss	28
3.2.2.	Molekularbiologische und genetische Standardmethoden	29
3.2.2.1.	Präparation von Plasmid-DNA	29
3.2.2.2.	Reinigung von PCR-Produkten und DNA aus dem Gel	29
3.2.2.3.	Restriktion von DNA	30
3.2.2.4.	Agarose-Gelelektrophorese	31
3.2.2.5.	Ligation von DNA	31
3.2.2.6.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
3.2.2.7.	Fluoreszenzbasierte Sequenzierung	32
3.2.2.8.	Transformation von <i>E. coli</i> mit Ca <sup>2+</sup> -kompetenten Zellen	34
3.2.2.9.	Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.2.2.10.	Isolation von chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i>	35
3.2.2.11.	Transformation von <i>B. subtilis</i>	35
3.2.2.12.	β-Galaktosidase-Assay	36
3.2.3.	Biochemische Methoden	37
3.2.3.1.	Zellaufschluss	37
3.2.3.2.	Proteinfällung	37
3.2.3.3.	Proteinbestimmung	37
3.2.3.4.	Analyse der Komplexe mittels Gelfiltration	38
3.2.3.5.	Prinzip der Affinitätsreinigung über StrepTactin-Affinitätssäulen	39
3.2.3.6.	Expression und Reinigung der Proteine SigB und RsbW	40
3.2.3.7.	Expression und Reinigung des Proteins RsbV	42
3.2.3.8.	Komplexanalyse von SigB und RsbW durch Fluoreszenzmessung	42
3.2.3.9.	SDS-PAGE	43
3.2.3.10.	Native (nichtdenaturierende) Gelelektrophorese	44
3.2.3.11.	2D-Proteinelektrophorese	45
3.2.3.12.	MALDI-TOF-Analysen	48
3.2.3.13.	Proteinnachweis durch Gelfärbung	49
3.2.4.	Immunologische Methoden	51
3.2.4.1.	Western-Blot und Immundetektion	51
3.2.4.2.	Western-Blot zur Analyse der Mutanten	51
3.2.4.3.	Quantitativer Western-Blot	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
4.1.	Analyse der Protein-Interaktionen von SigB, RsbW und RsbV	53
4.1.1.	Proteinexpression und Reinigung	53
4.1.1.1.	Klonierung der Gene <i>rsbV</i> , <i>rsbW</i> , <i>sigB</i> mit dem <i>Strep</i> -tag	

	Expressionsvektor pASK-IBA3	53
4.1.1.2.	Reinigung der Proteine SigB, RsbW und RsbV	54
4.1.1.3.	„In vitro“-Herstellung von gereinigtem RsbV-P	57
4.1.2.	Analyse des Oligomerisierungsgrades der gereinigten Proteine SigB und RsbW	58
4.1.3.	Bindungsstudien von SigB, RsbW und RsbV im Nativgel	59
4.1.4.	Analyse der Stöchiometrie der Komplexe RsbV/RsbW und RsbW/SigB	62
4.1.4.1.	Analyse der Stöchiometrie des RsbV/RsbW-Komplexes	63
4.1.4.2.	Analyse der Stöchiometrie des RsbW/SigB-Komplexes	64
4.1.4.3.	Untersuchung der RsbW/SigB-Stöchiometrie durch Fluoreszenzmessung	65
4.1.5.	Quantitative Western-Blot-Analyse	66
4.1.6.	Versuche zur Kristallisierung des Sigmafaktors SigB	70
4.2.	Untersuchungen zur Regulation der SigB-Aktivität bei Wachstum in der Kälte	71
4.2.1.	SigB-Induktion bei Wachstum in der Kälte	71
4.2.1.1.	Einfluss des Kältewachstums auf die Regulation von SigB	72
4.2.1.2.	Analyse der Mutanten im Western-Blot	73
4.2.1.3.	LacZ-Bestimmung zur Analyse der Mutanten	75
4.2.2.	Einfluss des Minimalmediums SMM auf die LacZ-Aktivität	77
4.2.2.1.	Messung der <i>ctc::LacZ</i> -Fusion	78
4.2.2.2.	Einfluss von SMM auf das Basalniveau von SigB, RsbW und RsbV	79
4.2.3.	Sind SigB, RsbV und RsbW während des Wachstums in der Kälte stabil?	80
4.2.4.	SigB-, RsbV- und RsbW-Level während des Wachstums in der Kälte	83
4.2.5.	„In vitro“-Analyse der Komplexbildung in der Kälte	84
4.2.6.	Analyse der Komplexe: Fraktionierung des Rohektraktes mittels Gelfiltration	85
4.2.7.	Analyse des Phosphorylierungsstatus von RsbV mit Hilfe der Western-Blot-Analyse von zweidimensionalen Gelen	88
4.2.8.	Nachweis der Induktion des Regulons in 2D-Gelen	89
4.2.9.	Haben die im <i>dnaK</i> -Operon kodierten Proteine DnaJ, YqeT, YqeU und YqeV einen Einfluss auf die SigB-abhängige Kältereulation?	92
4.2.9.1.	Charakterisierung des Kältewachstums der Einzelmутanten	92
4.2.9.2.	Einfluss einer DnaJ-Mutante auf die SigB-abhängige Kältereulation	93

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>95</b>
5.1.	Charakterisierung der Protein-Protein-Wechselwirkungen von RsbV, RsbW und SigB	95
5.2.	Regulation der SigB-Antwort bei Wachstum in der Kälte	102
5.2.1.	DnaJ, ein Regulator der SigB-Aktivität bei Wachstum in der Kälte?	112
5.2.2.	Modell der SigB-Regulation bei Kälte	113
5.3.	Ausblick	114
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b>	<b>124</b>
<b>9</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>125</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat
chDNA	Chromosomale DNA
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
2D-Gele	Zweidimensionale Gelelektrophorese
DSM	Difco-Sporulations-Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
EtOH/ Et	Ethanol
Em <sup>R</sup>	Erythromycin-Resistenz
FPLC	Fast protein liquid chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilized pH-gradient
kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
Km <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
LB	Luria Bertani Broth
MALDI-TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Time-Of-Flight
MG	Molekulargewicht
MU	Miller Units
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidene Difluoride

RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
Rsb	Regulator von Sigmafaktor B
RT	Raumtemperatur
Sig	Sigmafaktor
Spc <sup>R</sup>	Spectinomycin-Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris/HCl Buffered Solution
TE	Tris-EDTA-Puffer
TF	Transformation
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
ÜN	Über Nacht
Ük	Übernachtskultur
UZ	Ultrazentrifuge
WT	Wildtyp
w/v	weight/volume



## 1 Zusammenfassung

In *Bacillus subtilis* wird die generelle Stressantwort, welche zu einer multiplen, unspezifischen und vorsorglichen Stressresistenz führt, durch den alternativen Sigmafaktor SigB strikt reguliert. Eine Aktivierung von SigB erfolgt nach Einwirkung von Umwelt- oder metabolischem Stress. Primärer Regulator der SigB-Aktivität ist der Antisigmafaktor RsbW, der durch seine Bindung an SigB eine Expression des generellen Stressregulons während der exponentiellen Wachstumsphase verhindert. SigB liegt im Komplex mit RsbW in einem inaktiven Zustand vor. In seiner Funktion als Serinkinase phosphoryliert RsbW den Anti-Antisigmafaktor RsbV und inaktiviert diesen. Umwelt- bzw. metabolischer Stress vermitteln über die Phosphatasen RsbU oder RsbP eine Dephosphorylierung und damit die Aktivierung von RsbV. RsbV bindet daraufhin RsbW, wodurch SigB freigesetzt wird und mit der Core-RNA-Polymerase interagieren kann.

Im ersten Abschnitt der Dissertation konnten die mit einem *Strep*-tag versehenen Proteine SigB, RsbW und RsbV unter nativen Bedingungen gereinigt werden. Unter Ausnutzung der Kinasefunktion von RsbW gelang es, „in vitro“ RsbV-P herzustellen. Bindungsstudien im Nativgel, in denen bekannte Protein-Interaktionen nachvollzogen wurden, bestätigten die Aktivität der Fusionsproteine. Durch native Gelelektrophorese, Messung der Tryptophanfluoreszenz und mittels Gelfiltrationsstudien konnte die Annahme unterstützt werden, dass RsbW und SigB bzw. RsbV und RsbW in den Komplexen in einem Verhältnis von 2:1 vorliegen. Bei einem hohen Überschuss an RsbW bildet sich vermutlich eine zweite RsbW/SigB-Komplexform mit einer Stöchiometrie von 1:1. Quantitative Western-Blot-Analysen ergaben, dass die Proteine SigB, RsbW und RsbV „in vivo“ während des exponentiellen Wachstums im Verhältnis 1:2:4 vorliegen. Die Einwirkung von Hitze und Salz führte zu einer 2-3fachen Zunahme und Ethanolstress zu einer 3-4fachen Zunahme der Proteinmenge, wobei sich das molare Verhältnis der Proteine zueinander offensichtlich kaum veränderte. Unter Berücksichtigung der ermittelten Komplexzusammensetzung deutet sich an, dass die Proteine „in vivo“ in einem genau ausgewogenem Verhältnis vorliegen und vermutlich kein drastischer Überschuss von RsbW vorhanden ist.

Im Mittelpunkt des Hauptteils der Arbeit stand die Regulation der SigB-Aktivität während des Wachstums bei niedriger Temperatur. Western-Blot-Analysen und die Messung von *ctc::lacZ*-Reportergenfusionen des Wildtyps 168 sowie der isogenen *rsbU*-, *rsbP*-, *rsbUP* und *rsbV*-Mutanten konnten nachweisen, dass diese Regulatoren keine essentielle Funktion für die SigB-Aktivierung bei niedriger Temperatur ausüben. Im Gegensatz zu bisher untersuchten Stressarten wurde die SigB-Aktivität erst etwa 20 Stunden nach dem Temperaturshift voll induziert, wobei die Induktion mindestens ebenso stark war wie bei den bisher untersuchten Stimuli. Die RsbV-unabhängige Aktivierung von SigB ist bemerkenswert

und weist auf einen völlig neuen Weg der SigB-Aktivierung hin. In der Folge gelang es den Nachweis zu führen, dass sowohl SigB, RsbV als auch RsbW bei niedriger Temperatur stabil waren und auch eine proportionale Akkumulation aller drei Proteine erfolgte. Mit der nativen Gelelektrophorese konnte belegt werden, dass die heterolog in *E. coli* exprimierten Proteine RsbV, RsbW und SigB auch bei Temperaturen von 15°C und 4°C zur Komplexbildung fähig waren. Es deutet sich damit an, dass bei niedriger Temperatur vermutlich ein anderes, bisher unbekanntes Protein die Bildung der RsbW/SigB-Komplexe und damit die Funktion von RsbW unterbindet. In Übereinstimmung mit dieser These zeigten Gelfiltrationsexperimente und 2D-Gelelektrophoresen von *B. subtilis*-Rohextrakten, dass RsbV bei niedriger Temperatur weder phosphoryliert noch komplexiert vorlag.

## 2 Einleitung

*Bacillus subtilis* ist ein Gram-positives Bakterium, dessen natürliches Habitat der Boden ist. Besonders bekannt ist *B. subtilis* durch die intensive Untersuchung der Sporulation, da sie ein einfaches Modell der Zelldifferenzierung darstellt. Durch asymmetrische Teilung entstehen Mutterzelle und die kleinere Vorspore, die miteinander interagieren, in denen aber unterschiedliche Programme der Genexpression ablaufen. *B. subtilis* lässt sich leicht kultivieren. Die Vorspore bildet die extrem resistente Spore, während in der Mutterzelle eine terminale Differenzierung abläuft und diese Mutterzelle schließlich lysiert. Die Sporulation stellt sicher eine der speziellen Adaptionsstrategien an das Leben im Boden dar.

Im Boden ist *B. subtilis* verschiedensten, häufig wachstumsinhibierenden Einflüssen wie zum Beispiel Hitze, Kälte und Trockenheit ausgesetzt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich *B. subtilis* im Boden den größten Teil der Zeit in einem nicht-wachsenden oder sehr langsam wachsenden Zustand (Generationszeit 50-100 Stunden) befindet. Um konkurrenzfähig zu sein und auch unter widrigen Bedingungen zu überleben, verfügt *B. subtilis* nicht nur über die Sporulation, sondern auch über verschiedenste andere Anpassungsmechanismen. Zu den offensiven Strategien gehören die Erschließung alternativer Nährstoff- und Energiequellen (z.B. Stickstoffkontrolle oder Katabolitrepression) oder die Reaktion auf oxidativen Stress. Außerdem hat *B. subtilis* die Möglichkeit auch defensive Reaktionen wie die „stringent-response“ zu nutzen. Nur unter Bedingungen, welche ein Überleben im vegetativen Zustand nicht mehr zulassen, nutzt *B. subtilis* die Option zu sporulieren.

Wachstumsinhibierende Stimuli, die ein vegetatives Überleben noch zulassen, wie z.B. Hitze, pH-Stress, osmotischer Stress oder Sauerstoffradikale haben zur Entwicklung eines sehr komplizierten Adaptionsnetzwerkes geführt. Eine wichtige Komponente dieses Netzwerkes ist die generelle Stressantwort. Der entscheidende Regulator dieser Antwort, der alternative Sigmafaktor SigB wurde schon vor über 20 Jahren von Haldenwang und Losick entdeckt (Haldenwang & Losick 1979, 1980), wobei seine eigentliche Funktion noch bis Anfang der 90iger Jahre verborgen blieb. 1993/94 gelang es den Arbeitsgruppen um W. G. Haldenwang, M. Hecker und C. W. Price fasst zeitgleich und unabhängig voneinander den Nachweis zu führen, dass dieser alternative Sigmafaktor SigB in die Regulation der Genaktivität nach Einwirkung von Stressfaktoren wie Hitze, Salz, Ethanol oder Säurestress eingreift (Benson & Haldenwang 1993 c, Boylan et al. 1993 a, Hecker et al. 1988, Richter & Hecker 1986). Heute weiß man, dass das SigB-abhängige generelle Stressregulon wenigstens 150 Gene umfasst (Peterson et al. 2001, Price 2000, Price et al. 2001) Während die Sporulation vor

allem als Antwort auf Hunger (Nährstofflimitation) aufzufassen ist, wird die allgemeine Stressantwort hingegen durch metabolischen Stress und durch Umweltstress ausgelöst.

Da sich diese Arbeit vor allem mit Aspekten der Regulation der generellen Stressantwort beschäftigt, soll in der Einleitung zunächst ausführlich der Kenntnisstand zur Signaltransduktion und die Expression der SigB-abhängigen Gene dargestellt werden.

## 2.1. Aufbau des *sigB*-Operons

Der Sigmafaktor SigB wird vom siebten Gen des *sigB*-Operons kodiert, welches neben *sigB* sieben weitere Gene enthält, die alle Regulatoren von SigB kodieren (Kalman et al. 1990) (Wise & Price 1995) (Abb. 1). Ein vegetativer Promotor ( $P_A$ ) am Beginn des Operons, welcher von dem vegetativen Sigmafaktor SigA erkannt wird, sorgt für die Expression eines geringen Basalniveaus aller acht Proteine. Ein zweiter, interner SigB-abhängiger Promotor ( $P_B$ ) kann eine verstärkte Transkription der Gene (*rsb* = *r*egulator of *s*igma*B*) *rsbV*, *rsbW*, *rsbX* und *sigB* selbst bewirken (Benson & Haldenwang 1993b) (Boylan et al. 1993a, Boylan et al. 1993b) (Völker et al. 1994) (Völker et al. 1995a). Dieser interne Promotor wird von SigB erkannt, was zu einer erhöhten Transkription der vier Gene nach Hunger und Stress führt (positive Autoregulation von SigB). Wie die Beschreibung des Signaltransduktionsweges im nächsten Absatz zeigt, wird die SigB-Aktivität außerdem noch durch weitere Regulatoren beeinflusst, welche nicht in diesem Operon lokalisiert sind.

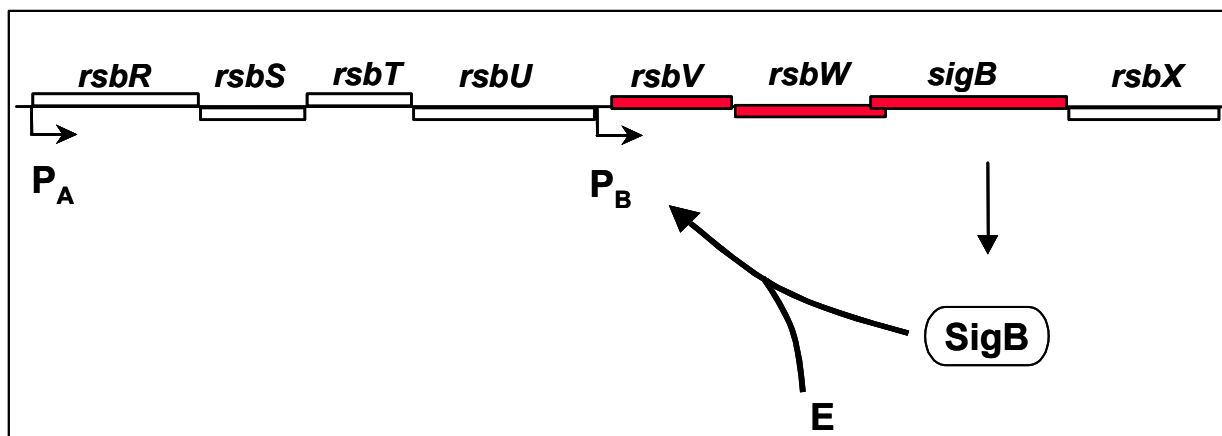


Abb. 1 Aufbau des *sigB*-Operons

## 2.2. Regulation der SigB-Aktivität

Die Expression des generellen Stressregulons wird über die Aktivität des Sigmafaktors SigB reguliert. Die meisten zum SigB-Regulon gehörenden Proteine unterliegen einer Doppelkontrolle und werden deshalb auch dann auf Basalniveau synthetisiert, wenn kein induzierender Stress einwirkt. Eine Aktivierung des Sigmafaktors bewirkt eine verstärkte Synthese dieser Proteine. Unter extremen Stressbedingungen können sie bis zu 30% der Gesamttranslationskapazität der Zelle ausmachen. Wie erfolgt nun die Regulation von SigB? Zum Vergleich: In *E. coli* wird die generelle Stressantwort gesteuert, indem die RpoS-Menge (RpoS ist ein zu SigB funktionell analoger Sigmafaktor) vor allem auf posttranskriptioneller Ebene durch Kontrolle der Translation und Proteolyse reguliert wird. SigB hingegen ist ein stabiles Protein (Redfield 1996). Wie in Abb. 2 zu sehen, wird die Aktivität von SigB durch eine große Anzahl an Regulatorproteinen reguliert, wobei viele Protein-Protein-Interaktionen in dieser Regulationskaskade mittels Serin- und Threonin-Phosphorylierungen gesteuert werden (Haldenwang 1995, Price 2000).

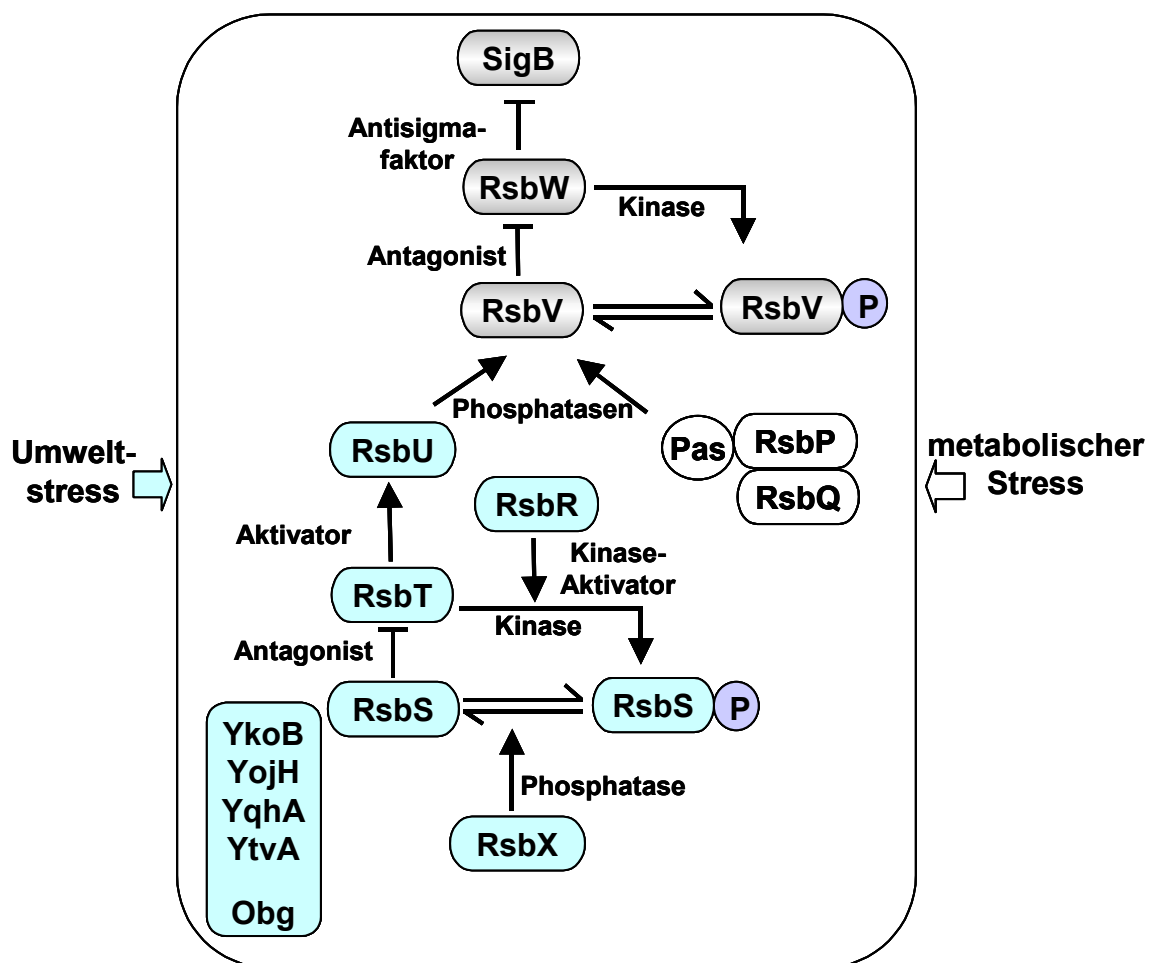


Abb. 2 Modell der Regulation der SigB-Aktivität.

Wie Abb. 2 zeigt, sind RsbV und RsbW die „primären“ Regulatoren (Price 2002) der SigB-Aktivität. Während des exponentiellen Wachstums wird SigB durch seinen Antisigmafaktor RsbW in einem stabilen Komplex gehalten und dadurch inaktiviert. *rsbW*-Mutanten zeigen schwere Wachstumsdefekte durch die deregulierte, hohe Expression des SigB-Regulons (Benson & Haldenwang 1992, Boylan et al. 1992). Eine Aktivierung von SigB nach Stress erfolgt immer über RsbV, den Anti-Antisigmafaktor, welcher nun seinerseits RsbW stabil binden kann. Da RsbW entweder mit SigB oder RsbV, aber nicht mit beiden zeitgleich einen stabilen Komplex bilden kann, wechselt RsbW aus der SigB-Bindung zu RsbV und der freigesetzte Sigmafaktor kann an die Core-RNA-Polymerase binden (Benson & Haldenwang 1993 a). Wegen der Eigenschaft von RsbW die Bindungspartner zu wechseln, wird dieser Regulationsmechanismus „Partner-Switching“ (Alper et al. 1994; Yang et al. 1996) genannt. Ob ein RsbV/RsbW- oder ein RsbW/SigB-Komplex vorliegt, hängt entscheidend von der posttranslationalen Modifikation von RsbV ab (Alper et al. 1996, Dufour & Haldenwang 1994, Yang et al. 1996). In der wachsenden Zelle liegt RsbV dephosphoryliert vor. Die posttranslationale Modifikation am konservierten Serin56 verhindert eine Komplexbildung mit RsbW (Dufour & Haldenwang 1994). Die Phosphorylierung erhält RsbV während des exponentiellen Wachstums in Gegenwart eines hohen ATP-Spiegels durch RsbW (Alper et al. 1996), wobei RsbW als weitere Funktion eine hochspezifische Serinkinaseaktivität für RsbV besitzt. Somit hängt die Entscheidung, ob das große Regulon aktiv oder inaktiv ist, allein vom Phosphorylierungsstatus des RsbV-Proteins ab. Abhängig vom aktivierenden Stress wird das Phosphat von RsbV durch eine der beiden PP2C-Phosphatasen - RsbU oder RsbP - (Vijay et al. 2000, Yang et al. 1996) entfernt, was RsbV erlaubt, RsbW aus dem RsbW/SigB-Komplex zu lösen und RsbW zu binden, wodurch SigB freigesetzt wird. Auf die beiden unterschiedlichen Induktions-/bzw. Regulationswege nach Umwelt- und metabolischem Stress soll nun getrennt eingegangen werden.

### 2.2.1. Aktivierung von SigB nach Umweltstress

Umweltstress wie z.B. Hitzeschock, Salz, Säure und Ethanolstress (Völker et al. 1995 b) induzieren SigB über die Phosphatase RsbU, deren spezifisches Substrat RsbV-P ist (Yang et al. 1996). „In vitro“ konnte gezeigt werden, dass es sich bei RsbU um eine Phosphatase vom PPC2-Typ handelt (Yang et al. 1996). Zur Weiterleitung des Signals werden der Antagonist RsbS und das Bindungspartner-wechselnde-Protein RsbT benötigt (Dufour et al. 1996, Kang et al. 1996). RsbS und RsbT sind Paraloge der primären Regulatoren RsbV und RsbW (Kang et al. 1996). Bemerkenswert ist hierbei, dass RsbW der Negativregulator der SigB-Aktivität ist während RsbT als Positivregulator der RsbU-Phosphataseaktivität wirkt. In Abwesenheit von Umweltstress liegt RsbS unmodifiziert vor, kann RsbT binden und so

dessen Assoziation mit RsbU verhindern. Nach Einwirkung von Umweltstress wird RsbS spezifisch durch RsbT phosphoryliert, welches dadurch frei wird. RsbT kann dann als Aktivator an RsbU binden. Mutantenstudien haben außerdem gezeigt, dass RsbT essentiell für die Wahrnehmung von physikalischem Stress ist (Kang et al. 1998). Der Phosphorylierungszustand von RsbS ist abhängig vom Einfluss der RsbT-Kinase und der RsbX-Phosphatase, welche spezifisch für RsbS-P ist (Yang et al. 1996). RsbX bewirkt als „Feedback-Inhibitor“ durch die Dephosphorylierung von RsbS einerseits, dass die Antwort transient ist, andererseits wird die Stärke der Antwort begrenzt (Smirnova et al. 1998, Völker et al. 1997). Die SigB-Antwort erreicht nach 10-40 Minuten ein Maximum und fällt dann auf das Basalniveau zurück (Boylan et al. 1993 a, Maul et al. 1995, Völker et al. 1995 b).

RsbR wirkt im Gegensatz zu anderen Regulatoren nur modulierend auf die Kinaseaktivität von RsbT (Akbar et al. 1997). RsbR besitzt 30% Sequenzidentität mit dem C-terminalen Teil von RsbS (Gaidenko et al. 1997). Gereinigtes RsbR war in der Lage die RsbS-Kinaseaktivität von RsbT stark zu erhöhen (Gaidenko et al. 1999). RsbR ist jedoch selbst Substrat der Kinase RsbT und wird an zwei konservierten Threoninresten phosphoryliert. Das an beiden Threoninen phosphorylierte RsbR ist auch nicht mehr zur Stimulation der Kinase RsbT fähig (Gaidenko et al. 1999). Es wird daher angenommen, dass RsbR an der Signaltransduktion von Umweltsignalen beteiligt ist (Price 2002). Nach Empfang des Stimulus wirkt RsbR durch Anregung der Kinase RsbT zunächst positiv. Dieser Effekt ist jedoch nur vorübergehend, da die positive Wirkung als Folge der Threoninphosphorylierung von RsbR selbst unterbunden wird (Gaidenko et al. 1999). Im Gegensatz zu anderen Regulatoren wurde eine Funktion von RsbR nicht bei allen Umweltstressarten gefunden. *rsbR*-Mutanten zeigten bei Salz- und Hitzeschock, nicht aber nach Ethanolstress eine verminderte SigB-Antwort. Die Antwort wirkt nur modulierend, da die RsbR-Funktion sich vermutlich mit der anderer Regulatoren überschneidet. Im Folgenden sollen noch kurz weitere Regulatoren erwähnt werden, die erst seit kurzem bekannt sind und deren genaue Funktion noch nicht endgültig geklärt ist.

Durch Sequenzvergleiche wurden vier funktionell aktive Paraloge zu RsbR gefunden, die in Mutantenstudien dem RsbU-abhängigen Regulationsweg zugeordnet werden konnten (Akbar et al. 2001). Genetische Untersuchungen weisen darauf hin, dass RsbR sowohl neben der in Abb. 2 dargestellten positiven auch eine negative Rolle spielt. RsbR wirkt gemeinsam mit den Paralogen YkoB, YojH und YqhA als Negativregulator auf die SigB-Aktivität (Akbar et al. 2001). YtvA, welches eine PAS-Domäne (PAS=Per-Arnst-Sim) besitzt, wirkt unabhängig und als Positivregulator. PAS-Domänen sind weit verbreitet. Sie sind oft an Interaktionen mit anderen Proteinen oder an der Wahrnehmung des Energiezustandes von

Zellen im allgemeinen beteiligt. Häufig sind PAS-Domänen auch an der Messung von Redoxpotentialen, Licht- oder Sauerstoffkonzentrationen beteiligt (Taylor & Zhulin 1999). Eine einfache Einordnung in die lineare Signalkaskade war nicht möglich, so dass Akbar et al. (2001) eine Funktion der Paralogen im Komplex annehmen.

Von Scott und Haldenwang (1999) wurde ein weiterer Regulator gefunden, Obg, welcher für die Aufnahme von Signalen nach Umweltstress wichtig zu sein scheint. Obg wurde als ein essentielles GTP-bindendes Protein (Welsh et al. 1994) charakterisiert, welches im *spo0B* Operon kodiert wird und das essentiell für das Wachstum und die Sporulation ist (Scott et al. 1999, Trach & Hoch 1989, Vidwans et al. 1995). Im Hefe-Zwei-Hybriden-System konnte die Interaktion von Obg mit RsbT und RsbW gezeigt werden. Außerdem war Obg notwendig für die Aktivierung von RsbT nach Stress. (Scott & Haldenwang 1999). Die genaue Funktion von Obg ist aber unklar und eine genaue Einordnung von Obg in die Regulationskaskade ist noch nicht möglich (Scott et al. 2000).

Die These, dass das Ribosom als Sensor für Umweltstress dienen könnte, wurde durch die folgenden Studien erhärtet (Scott et al. 2000): In Gelfiltrationsstudien kofraktionierten Obg, RsbT, RsbS und RsbR mit der Ribosomenfraktion und im Affinitätsblot konnte eine Bindung von Obg an das ribosomale Protein L13 gezeigt werden (Scott et al. 2000). Zhang et al. (2001) zeigten, dass eine RplK-Mutante, welche das ribosomale Protein L11 nicht mehr besitzt und deshalb gegen das Antibiotikum Thiostrepton empfindlich ist, spezifisch nach Umweltstress zur Induktion des SigB-Regulons nicht mehr in der Lage war. Dabei konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Rsb-Proteine zwar noch aktiv, aber nicht mehr durch Stress aktivierbar waren. Diese Reaktion des Ribosoms war äußerst spezifisch, da sowohl die Stressanschaltung nach Energielimitation als auch die SigB-unabhängige Induktion von Chaperonen nicht beeinflusst wurde.

### 2.2.2. Aktivierung von SigB nach metabolischem Stress

Die Aktivierung nach metabolischem Stress ist RsbU-unabhängig. Die Aktivierung erfolgt über eine zweite PP2C-Phosphatase: RsbP. RsbP wird mit RsbQ in einem eigenen *rsbPQ*-Operon kodiert, dessen Promotor noch nicht bekannt ist. RsbP-Mutanten waren durch metabolischen Stress nicht mehr induzierbar (Vijay et al. 2000). RsbP besitzt neben der carboxyterminalen Phosphatasedomäne aminoterminal eine PAS-Domäne, von der angenommen wird, dass mindestens ein Rest essentiell für die Antwort auf Energiestress ist. Aus *B. subtilis* gereinigtes RsbP scheint ein Flavoprotein zu sein, so dass überlegt wird, ob Änderungen im Redoxzustand des Chromophors, welches an RsbP gebunden ist, die



Aktivität der C-terminal lokalisierten PP2C-Phosphatase-Domäne beeinflussen (Vijay et al. 2000). Ein solches „Monitoring“ des Redoxzustandes/bzw. Elektronenflusses würde eine Induktion des generellen Stressregulons erlauben, bevor der ATP-Level unter eine kritische Grenze sinkt. Von Brody et al. (2001) wurde ein weiterer Regulator, RsbQ, gefunden. RsbQ ist ein positiver Regulator von RsbP und agiert gemeinsam mit diesem. Im Hefe-Zwei-Hybriden-System konnte eine stabile Interaktion nachgewiesen werden. Sequenzanalysen lassen vermuten, dass es sich bei RsbQ um eine Hydrolase oder Acyltransferase der  $\alpha/\beta$  Faltblatt-Superfamilie (Ollis et al. 1992) handelt, deren Mitglieder eine große Anzahl an Reaktionen katalysieren. Genetische Analysen konnten zeigen, dass die katalytische Aktivität von RsbQ essentiell für die Antwort auf Energiestress ist: Eine *rsbQ*-Mutante glich im Phänotyp einer *rsbP*-Mutante (Brody et al. 2001). Brody et al. (2001) sind der Meinung, dass RsbQ nicht wie der Aktivator RsbT direkt an der Signaltransduktion beteiligt ist, sondern dass RsbQ durch seine katalytische Aktivität eine Konformationsänderung in RsbP von der inaktiven zur aktiven Form bewirkt.

Weiterhin ist zwar die Kinaseaktivität von RsbW gut untersucht, aber es ist noch unklar in wie weit RsbW selbst als Sensor von Energiestress an der Regulation beteiligt ist. Da der RsbV-Phosphorylierungsstatus von RsbP, RsbW und dem verfügbaren ATP abhängt, ist es denkbar, dass die Aktivität eines der beiden Enzyme oder die Aktivität beider durch den Energiestress reguliert wird. Bei einigen RsbU-unabhängigen Stimuli konnte gezeigt werden, dass der ATP-Spiegel abfällt (Maul et al. 1995, Völker et al. 1995). Alper et al. (1996) konnten zeigen, dass die RsbW-Kinase einen relativ hohen  $K_m$  für ATP besitzt und dass die Fähigkeit RsbV zu phosphorylieren abnimmt, wenn der ATP-Level während des Energiestresses sinkt. Es wird daher angenommen, dass bei Energiestress die RsbW-Kinaseaktivität sinkt und die RsbP-Phosphataseaktivität ansteigt, aber diese Annahmen sind bisher noch nicht durch Versuche belegt worden. Allerdings konnten bei Messungen des intrazellulären ATP-Levels nicht bei allen RsbU-unabhängigen Stressarten entsprechend niedrige ATP-Level gemessen werden (Maul et al. 1995). Daher kann man vermuten, dass die Regulation über den ATP-Level nur eine untergeordnete Rolle spielt oder nur in bestimmten Situationen wichtig ist.

Im Anschluss an die ausführliche Darstellung der SigB-Regulation soll kurz auf die Funktion der generellen Stressantwort in *B. subtilis* eingegangen werden.

### 2.3. Funktion der generellen Stressantwort in *B. subtilis*

Die Funktion der generellen Stressantwort wurde intensiv untersucht, indem die Stressresistenz einer *sigB*-Mutante mit einem Wildtypstamm verglichen wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine *sigB*-Mutante nach einem Säure- oder Ethanolchock nach zwei Stunden eine 50-100fach geringere Überlebensrate aufweist. Weiterhin war eine *sigB*-Mutante gegen Hitzestress 1000fach und gegen Salzstress 50-200fach sensibler als der Wildtyp (Völker et al. 1999).

Während des Übergangs vom wachsenden zum nicht wachsenden Zustand, statet die generelle Stressantwort die Zelle mit einem umfassenden, präventiven und unspezifischen Schutz gegen zukünftigen Stress aus (Engelmann et al. 1996, Antelmann et al. 1997, Gaidenko et al. 1998). Außerdem wird die Zelle durch Kreuzprotektion vor Hitze, Salz oder Säure geschützt, wenn sie vorher einem milden, nicht letalen Stress ausgesetzt wurde (Völker et al. 1999). Insgesamt ist die generelle Stressantwort an der Induktion von Proteinen beteiligt, welche beispielsweise zum Schutz vor oxidativem Stress, Säurestress, Adaption an Hitze, Salz und osmotischem Stress dienen. Wahrscheinlich ist die generelle Stressantwort auch an der Aufrechterhaltung des Redoxpotentials und dem Schutz der Zellintegrität beteiligt (Gaidenko et al. 1998, Peterson et al. 1999 b, Price 2000). Eine weitere Funktion ist die Sekretion toxischer Stoffe wie z.B. Antibiotika (Peterson et al. 1999 a).

### 2.4. Verbreitung von SigB innerhalb der Eubakteria

In einigen Enterobakterien (z.B. *E. coli*) wird die generelle Stressantwort durch den zu SigB analogen Faktor RpoS kontrolliert und ist dabei direkt in die Virulenz involviert, indem die generelle Stressantwort Schlüsselinteraktionen zwischen Wirt und Pathogen beeinflusst (Henнге-Aronis 2000). In nahen Verwandten von *B. subtilis*, *Bacillus licheniformis* (Brody et al. 1998) und *Listeria monocytogenes* (Becker et al. 1998, Wiedmann 1998, <http://www.Tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>) wurde das 8-Gen-SigB-Operon gefunden.

*L. monocytogenes* ist ein intrazelluläres Pathogen, welches Lebensmittelvergiftungen verursacht. Die generelle Stressantwort induziert in diesem Organismus eine signifikante Kreuzprotektion, beispielsweise bei Säurestress, Ethanolstress und Hitzeschock (Lou et al. 1997, ODriscoll et al. 1996). Von Becker et al. (1998) konnte SigB-Aktivität auch nach Kälteschock gezeigt werden. Es wird angenommen, dass die SigB-Funktion auch wichtig für die Virulenz ist, wie zum Beispiel bei der Passage des sauren Magenmilieus, beim

Entkommen vor Phagozytose und bei der Ausbreitung in der Zielzelle (Rocourt & Cossart 1997).

In *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (Knobloch et al. 2001, Kullik & Giachino 1997, Wu et al. 1996) und *Bacillus anthracis* (Fouet et al. 2000) wurden verkürzte SigB-Operons gefunden (RsbU, RsbV, RsbW und SigB in *S. aureus*). Bei *S. aureus* konnte die Transkription des Koagulasegens („in vivo“ und „in vitro“) und die Staphyloxanthin-Produktion („in vivo“) als SigB-abhängig identifiziert werden. Staphyloxanthin ist ein goldfarbendes Pigment auf frischen klinischen Isolaten, welches wahrscheinlich zur Resistenz gegen Austrocknung beiträgt (Grinsted & Lacey 1973). Es wird angenommen, dass Produkte, welche mit Stressresistenz und vielleicht Pathogenität assoziiert sind, unter SigB-Kontrolle stehen. (Chan et al. 1998, Kullik et al. 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die RsbU-Phosphatase wichtig für die Stressresistenz und die Biofilmbildung ist (Knobloch et al. 2001, Rachid et al. 2000). Es wird angenommen, dass zwischen der SigB-Regulation von *S. aureus* und *B. subtilis* Unterschiede bestehen müssen, da *S. aureus* keine Orthologe für RsbR, RsbS und RsbT besitzt (Gertz et al. 1999, Kullik & Giachino 1997).

Weitere Organismen, die SigB-ähnliche Operons besitzen, sind beispielsweise *Mycobakterium tuberculosis* (De Maio et al. 1997, 1996) und *Streptomyces coelicolor* (Kormanec et al. 2000).

SigB ist nicht vorhanden in Mycoplasmen. Wahrscheinlich benötigen Mycoplasmen SigB aufgrund der speziellen ökologischen Nische nicht (Fraser et al. 1995, Himmelreich et al. 1996, 1997).

## 2.5. Einleitung der Sporulation durch Aktivierung von SigF

Auf die Aktivierung des Sigmafaktors SigF soll hier näher eingegangen werden, da es sich bei SigF, seinem Antisigmafaktor SpoIIAB und dem Anti-Antisigmafaktor SpoIIAA um zu SigB, RsbW und RsbV in Sequenz und Funktion ähnliche Proteine handelt. Die Regulation von SigF erfolgt mittels eines zu SigB ähnlichen „Partner-Switching“-Systems.

Bei der Sporulation entstehen durch asymmetrische Teilung die Mutterzelle und eine kleinere Spore. SigF wird zu Beginn der Sporulation in der noch ungeteilten Zelle (Sporangium) gebildet, wird aber erst am Anfang der Zellteilung in der Vorspore aktiv. Von SigF ist eine Kaskade von zellspezifisch wirkenden regulatorischen Proteinen abhängig. Wie wird erreicht, dass die SigF-abhängige Transkription nur in der Vorspore und nicht in der Mutterzelle abläuft? Die Aktivität von SigF hängt von drei regulatorisch wirkenden Proteinen ab: Dem

Antisigmafaktor SpoIIAB, dem Anti-Antisigmafaktor SpoIIAA und der membrangebundenen Phosphatase SpoIIIE (Duncan et al. 1995, Schmidt et al. 1990). SigF wird vor der Zellteilung in der Mutterzelle durch seinen Antisigmafaktor SpoIIAB komplexiert und dadurch inaktiviert (Duncan & Losick 1993). In der Vorspore reagiert der Anti-Antisigmafaktor SpoIIAA mit dem SpoIIAB/SigF-Komplex, der dadurch zerfällt und SigF freisetzt. Wie RsbV kann auch SpoIIAA nur im nicht-phosphorylierten Zustand den Komplex angreifen (Duncan et al. 1996). SpoIIAA wird durch SpoIIAB phosphoryliert, da SpoIIAB ebenso wie RsbW über eine Kinasefunktion verfügt. (Duncan & Losick 1993, Garsin et al. 1998, Min et al. 1993) Durch die Phosphatase SpoIIIE wird SpoIIAA dephosphoryliert (Arigoni et al. 1996, Duncan et al. 1995, Feucht et al. 1996). Das Besondere an der Phosphatase SpoIIIE ist ihre spezifische Lokalisation im polaren Septum (Arigoni et al. 1995), welches Vorspore und Mutterzelle trennt. In dem kleineren Volumen der Vorspore kommt es dadurch zu einer lokalen Erhöhung der Phosphatasemenge gegenüber der Kinasemenge. Dadurch wird in der Vorspore, im Vergleich zur Mutterzelle/bzw. zum Sporangium, mehr SpoIIAA dephosphoryliert als durch die Kinase SpoIIAB zur selben Zeit phosphoryliert wird. Allerdings waren SpoIIIE-Mutanten, in denen die membranspannenden Domänen von SpoIIIE so abgeschnitten wurden, dass SpoIIIE cytoplasmatisch vorlag, noch in der Lage SigF zu aktivieren und zu sporulieren, wenn auch weniger effizient als der Wildtyp. Dies deutete darauf hin, dass es noch einen weiteren Weg der Regulation geben musste. Interessanter Weise wurde in neuesten Studien gezeigt, dass freies SpoIIAB (im Gegensatz zu komplexiertem SpoIIAB) proteolytisch instabil ist und nach etwa 25 Minuten durch die ClpCP-Protease (Pan et al. 2000) abgebaut wird. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass in der Vorspore durch die geringere Menge an SpoIIAB weniger SigF/SpoIIAB-Komplex vorliegt und SigF so zellspezifisch aktiviert werden kann. Wie kann eine geringere SpoIIAB-Menge in der Vorspore erreicht werden? Dazu haben Dworkin und Losick (2001) und Pan et al. (2001) das folgende Modell vorgeschlagen: Da die asymmetrische Zellteilung vor der Chromosomensegregation stattfindet, liegen nur ca. 30% des Chromosoms, der Teil, welcher sich in der proximalen Ori-Region befindet, in der Vorspore vor (Wu & Errington 1994, 1998). Der übrige Anteil des Chromosoms wird danach durch eine DNA-Translokase (SpoIIIE), welche wie SpoIIIE im Septum lokalisiert ist, in die Vorspore gepumpt. Also werden Gene, welche außerhalb der proximalen Ori-Region liegen, für einen transienten Zeitraum aus der Vorspore ausgeschlossen (Frandsen et al. 1999). Die Gene für SigF, SpoIIAA und SpoIIAB liegen in den Regionen des Chromosoms, welche zuletzt in die Vorspore transportiert werden. SpoIIAB kann zwar in der Mutterzelle und Spore gleichermaßen abgebaut werden, aber durch die „transiente genetische Asymmetrie“ (Dworkin & Losick 2001) kann in der Vorspore kein SpoIIAB nachgebildet werden, um das abgebaute SpoIIAB zu ersetzen. Im Vergleich zu den stabileren Partnern SigF und SpoIIAA sinkt der Level an SpoIIAB in der Vorspore, so dass nicht genug

Antisigmafaktor vorhanden ist, um alles SigF zu komplexieren und SigF kann somit zellspezifisch aktiv werden (Dworkin & Losick 2001).

## **2.6. Regulation von SigF durch Phosphorylierung von SpoIIAA und die Komplexbildung von SpoIIAB in langlebige Intermediate**

In der Vospore sind die SpoIIAB-Kinase und SpoIIA-Phosphatase gemeinsam aktiv, wodurch SpoIIAA kontinuierlich zwischen der dephosphorylierten und der phosphorylierten Form zyklisiert (Magnin et al. 1997). Die Aktivität von SpoIIA ist aber sehr viel höher als die von SpoIIAB (Lucet et al. 1999), so dass in der Vospore fast alles SpoIIAA dephosphoryliert vorliegt (Feucht et al. 1996, King et al. 1999, Lewis et al. 1996). SpoIIAB kann SpoIIAA nicht nur phosphorylieren, sondern auch einen nicht-kovalenten Komplex mit SpoIIAA bilden (Alper et al. 1994). SpoIIAB geht während der Phosphorylierungszyklen einen langlebigen Komplex ein, wodurch es der Interaktion mit SigF entzogen wird. Erst nach Zerfall des Komplexes wird SpoIIAB wieder aktiv. Zu dem Zyklus der Phosphorylierung und dem langlebigen Komplex gibt es zwei unterschiedliche Modelle, die hier kurz dargestellt werden sollen:

Yudkin und Mitarbeiter (Lee et al. 2000) haben gezeigt (Abb. 3), dass die Phosphorylierungsreaktion eine biphasische Kinetik aufweist und dass nach jeder Phosphorylierungsrunde der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Rückkehr von SpoIIAB in die katalytisch aktive Form ist (Magnin et al. 1997). Dabei wird angenommen, dass die Affinität von SpoIIAB zu ADP und ATP gleich hoch ist, wobei beide Nukleotide in der biosynthetisch aktiven Spore vorliegen sollten.

Experimente, in denen limitierende Mengen an SpoIIAB und ein Überschuss an SpoIIAA eingesetzt wurden, stützen die Annahme einer ungewöhnlichen Konformation (SpoIIAB\*), welche ADP gebunden hat (Najafi et al. 1997; Lee et al. 2000). Das führte zu dem folgenden Modell: Immer wenn ein Molekül SpoIIAB in Anwesenheit von ATP die Phosphorylierung von SpoIIAA katalysiert, entsteht neben SpoIIAA-P SpoIIAB\*-ADP. SpoIIAB\*-ADP kann wieder mit einem neuen Molekül SpoIIAA zu dem tertiären Komplex SpoIIAA/SpoIIAB\*-ADP reagieren, der enzymatisch inaktiv ist. Es wird angenommen, dass während SpoIIAA gebunden ist, ein Austausch von ADP gegen ATP stattfindet und SpoIIAB wegen der ständigen Bindung an SpoIIAA nicht in der Lage ist, mit SigF zu interagieren (Lee et al. 2001). Außerdem wird ein zweiter Weg angenommen, indem SpoIIAB\*-ADP ohne den tertiären Komplex zu SpoIIAB-ADP relaxiert, ADP abdissoziiert und SpoIIAB wieder ATP binden kann (Lee et al. 2000). Es wird postuliert, dass SpoIIAB durch die Bindung von ATP

eine erhöhte Affinität zu SigF oder einem neuen Substratmolekül hat. Insgesamt bewirken die langlebigen Intermediate (SpollAB\*-ADP und seine Komplexe), dass SpollAB nicht zur Inhibierung von SigF zur Verfügung steht (Lee et al. 2000).

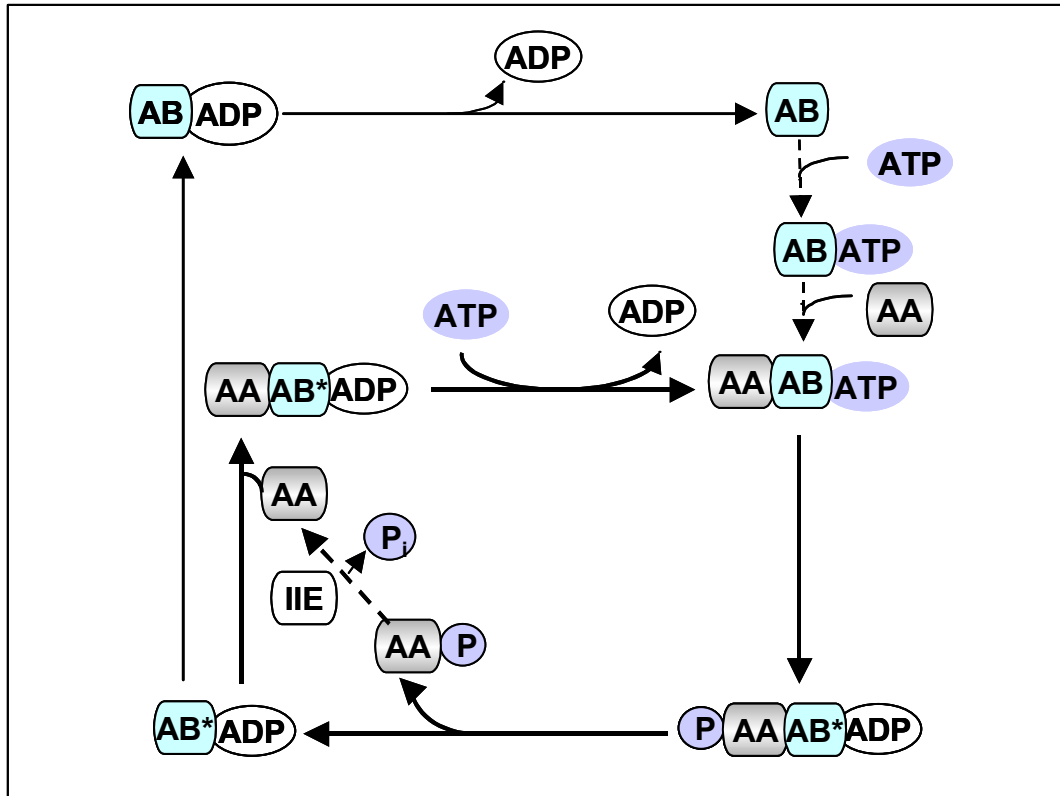
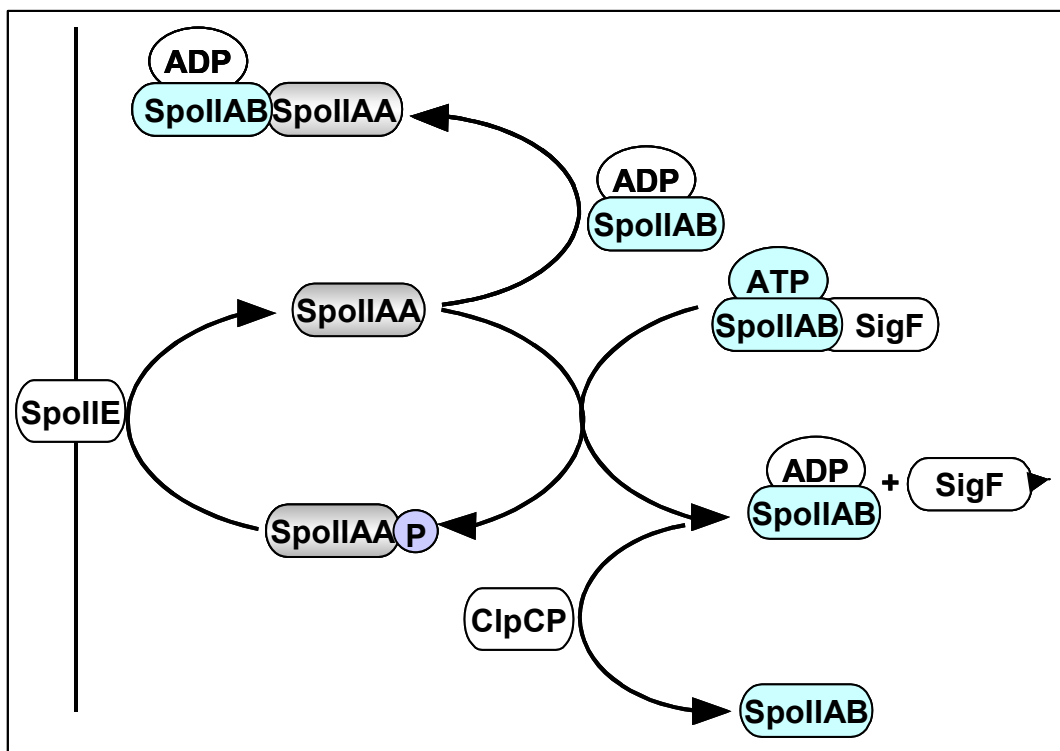


Abb. 3 Modell der SigF-Regulation nach Yudkin (Lee et al. 2000



**Abb. 4 Modell der SigF-Regulation entsprechend Losick (Pan 2001)**

Duncan et al. (1996) und Garsin et al. (1998) schlagen ein alternatives „induced-release“ genanntes Modell vor (Abb. 4), welches keinen ungewöhnlichen Zustand für SpoIIAB beinhaltet. Hier wird angenommen, dass SpoIIAA-P durch eine Reaktion von SpoIIAA mit einem SigF/SpoIIAB-ATP-Komplex gebildet wird. Die Umwandlung von ATP in ADP erzeugt eine Konformationsänderung bei SpoIIAB, in deren Folge SigF nicht mehr binden kann und abdissoziiert („induced release“). Dabei erhöht ADP die Affinität von SpoIIAB zu einem weiteren Molekül SpoIIAA, was zu einem langlebigen SpoIIAA/SpoIIAB-ADP Komplex führt. Vor einer weiteren Phosphorylierung ist die Dissoziation notwendig.

Einig sind sich die beiden Modelle in der Annahme, das SpoIIAB in der Vorspore durch die Bildung langlebiger Komplexe in seiner Funktion (Inaktivierung von SigF) inhibiert wird.

**2.7. Zielstellung**

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war, das Komplexbildungsverhalten und die Stöchiometrie von SigB, RsbW und RsbV zu untersuchen. Dazu sollten die drei Proteine überproduziert und gereinigt werden. Die gereinigten Proteine sollten für die „in vitro“-Analyse der Komplexe RsbW/SigB und RsbV/RsbW eingesetzt werden. Es war geplant, die Studien unter Nutzung der nativen Gelelektrophorese und Fluoreszenzspektroskopie durchzuführen.

Im Hauptteil sollte die bisher noch nicht bekannte Regulation der SigB-Aktivität bei *B. subtilis* bei Wachstum in der Kälte unter Nutzung biochemischer und physiologischer Methoden untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte auch analysiert werden, ob das Chaperon DnaJ bei Kälte einen Einfluss auf die Regulation der SigB-Aktivität hat.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Geräte und Hilfsmittel

**Tab. 1 Geräte und Hilfsmittel**

Gerätetyp	Hersteller
Autoklav Certoklav	HMC
Anionenaustauschermaterial Q-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech
Anionenaustauschersäule Recourse Q (6ml)	Amersham Pharmacia Biotech
Dialysemembran für Klonierungen	Nalgene
DNA-Elektrophoresekammern	Biorad, Hoefer
Entsalzersäulen (2,5 ml) PD-10	Amersham Pharmacia Biotech
Filter für Reinigungspuffer (500 ml)	Nalgene
Filter für Spritzen	Merck
Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse	Varian
FPLC	Amersham Pharmacia Biotech
Gelfiltrationssäule Superdex 75	Amersham Pharmacia Biotech
Gelfiltrationssäule Superdex 200	Amersham Pharmacia Biotech
Gelschüttler	GFL
Gene Pulser™ zur Elektroporation	Biorad
Gießkammer für Gele (19 x 23 cm)	ESA, Maryland
Gießkammer für Gele (5 x 7 cm)	Biorad
Hybridisierungssofen	Bachofer, Biometra
IEF-Kammer Multiphor	Amersham Pharmacia Biotech
Kälteschrank für Proteinreinigung	Spröck Kältetechnik
Kühlzentrifuge 2K15	Sigma
Kühlzentrifuge RC 26 Plus	Sorvall
Magnetrührer MR2002	Heidolph
Mikrowelle	AEG
Minicycler™	Biozym
Nitrocellulosemembran PROTRAN	Schleicher & Schuell
pH-Messgerät Mettler Toledo	Mettler
Phosphoimager MD STORM 860	Molecular Dynamics
Photometer Ultrospec 4000	Amersham Pharmacia Biotech
Protein-Blotting-Kammer	Sigma
Protein-Elektrophoresekammer (2D)	ESA
Protein-Elektrophoresekammer (2D) Protean Plus Dodeca Cell	Biorad
Protein-Elektrophoresekammern (1D)	Biorad, Sigma
Protein-Konzentrator OmegaCell (10ml)	Pall Filtron
Protein-Konzentrator Centricon (2 ml) (3 kDA, 10 kDA)	Millipore
Rotor-SS-34 (10 ml)	Sorvall
Rotor-SLA3000 (250-500 ml)	Sorvall
Rotor-GSA (50-100 ml)	Sorvall
Schüttelwasserbäder GFL1086, SS40-D, OLS2000	GFL, Grant
Schüttelinkubator Innova 4230	New Brunswick
Sequenzierer (Liquor)	Amersham Pharmacia Biotech
Speed-Vac CON1000	LTF Labortechnik
Thermoblock QBT2	Grant
Thermocycler	Progene
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Ultraschallgerät Labsonic U	B. Braun
Ultrazentrifuge Centricon T-1080	Kentron Instruments
UZ-Rotor-EFT80.1 (2 ml)	Kentron Instruments



UZ-Rotor-Ti-75 (10 ml)	Kentron Instruments
Vakuumpumpen	Vacuubrand
Videoprinter	Biotech-Fischer
Vortex	Heidolph
Voyager TM Massenspektrometer	Perseptive
Zentrifuge Sorvall RC26 Plus	Sorvall

### 3.1.2. Software

**Tab. 2 Software**

Bezeichnung	Hersteller
MS Office 2000	Microsoft, USA
Image Quant	Molecular Dynamics, USA
Swift II	Amersham Pharmacia Biotech
Vektor NTI 5.0.3.	InforMax, USA

### 3.1.3. DNA-Marker

**Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas)**

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 250 bp

### 3.1.4. Proteinstandards

**Tab. 3 vorgefärbter Proteinmarker für SDS-Gele (MBI Fermentas)**

Protein	kDa
β-Galaktosidase	118,0
BSA	79,0
Ovalbumin	47,0
Carbonic Anhydrase	33,0
β-Lactoglobulin	25,0
Lysozym	19,5

**Tab. 4 nicht gefärbter Proteinmarker für SDS-Gele (MBI Fermentas)**

Protein	kDa
β-Galaktosidase	118,0
BSA	66,2
Ovalbumin	45,0
Laktatdehydrogenase	35,0
Restriktionsendonuklease	25,0
Bsp981	25,0
β-Laktoglobulin	18,4
Lysozym	14,4

**Tab. 5 einzelne Molekulargewichtsmarker für Gelfiltration (Sigma)**

	Standard	kDa
1	Apoferitin	440
2	$\beta$ -Amylase	200
3	ADH	150
4	BSA	66
5	Carbonic Anhydrase	29
6	Cytochrom C	12,4

### 3.1.5. Kits

Die folgenden Kits wurden eingesetzt:

Plasmidisolation: Mini-und Midikit (Qiagen), GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech)

Sequenzierung: Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP

(Amersham Pharmacia Biotech)

Proteinkristallisation: HR2-10 Pufferkit (Hampton Research)

Kolorimetrische Western-Blot-Detektion: Alkalische Phosphatase-Konjugat Substrat Kit (Biorad)

### 3.1.6. Enzyme

**Tab. 6 Enzyme**

Enzyme	Hersteller
Enzyme	Amersham Pharmacia Biotech, Boehringer Mannheim
<i>Bsal</i>	NEB
Pfu-Polymerase	Stratagene

### 3.1.7. Verwendete Substanzen

**Tab. 7 Substanzen**

Substanz	Hersteller
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure	Sigma
Aceton	Merck
Acetonitril	Merck
Acrylamid 40%	Amersham Pharmacia Biotech
Agar	Gibco
Agarose	Gibco
AgNO <sub>3</sub> (Protein grade)	AppliChem
AHT	IBA
Ampicillin	Sigma
Anhydrotetracyclin	IBA
APS	Amersham Pharmacia Biotech
Bacto Tryptone	Sigma
Biorad-Protein-Assay	Biorad
Bis-Acrylamid 2%	Amersham Pharmacia Biotech
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Sigma

Casamino acids	Sigma
CHAPS	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Sigma
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck
dATP	Boehringer Mannheim
dCTP	Boehringer Mannheim
D-Glukose	Sigma
dGTP	Boehringer Mannheim
Diatomeenerde	Sigma
Dry Strip Cover Fluid	Amersham Pharmacia Biotech
DTT (für Rehydratisierung.)	Amersham Pharmacia Biotech
DTT (für Proteinreinigung)	BTS
ECF-Substrat	Amersham Pharmacia Biotech
EDTA	Boehringer Mannheim
Erythromycin	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Sigma
Ficoll 400	Roche
Formaldehyd 37%	Sigma
Formamid	Sigma
Glukose	Sigma
Glycerol 87%	Amersham Pharmacia Biotech
Glycin	Roth
Guanidin-Hydrochlorid	Sigma
HABA	Sigma
Harnstoff	Sigma
HCl	Merck
Hefeextrakt	Sigma
Hepes	Roth
Immobiline	Amersham Pharmacia Biotech
Iodacetamid	Sigma
Isoamylalkohol	Sigma
Kanamycin	Sigma
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma
KCl	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
L-Alanin	Sigma
L-Arginin	Sigma
LB-Agar	Sigma
LB-Broth	Sigma
L-Histidin	Sigma
L-Lysin	Sigma
L-Phenylalanin	Sigma
L-Tryptophan	Sigma
Lysin	Sigma
Lysozym	Sigma
Magermilchpulver „Glücksklee“	Nestle
Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Sigma
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	Sigma
MnSO <sub>4</sub>	Sigma
MOPS	Boehringer Mannheim

N,N-Dimethylformamid	Sigma
NaCO <sub>3</sub>	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5H <sub>2</sub> O	Sigma
Na <sub>3</sub> -Citrat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck
Na-Borat	Sigma
NaCl	Sigma
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Sigma
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck
NaN <sub>3</sub>	Sigma
NaOH	Sigma
n-Butanol	Roth
N-Lauroylsarcosin	Sigma
Nutrient Broth	Difco
ONPG	Sigma
Pharmalyte 3-10	Amersham Pharmacia Biotech
Phast Gel Blue R (Coomassie R350)	Amersham Pharmacia Biotech
Phenol	Sigma
Phenylalanin	Sigma
PMSF	Boehringer Mannheim
RbCl	Sigma
ReadySol-PAGE	Amersham Pharmacia Biotech
Repel-Silan ES	Amersham Pharmacia Biotech
Sequagel complete ultra pure	Biozym
Sequagel XR ultra pure	Biozym
SDS	Merck
Spectinomycin	Sigma
StrepTactin Sepharose	IBA
Sucrose	Sigma
Thioharnstoff	Sigma
Tris	Sigma
Tryptophan	Sigma
ZnCl <sub>2</sub>	Merck

### 3.1.8. Bakterienstämme

**Tab. 8 *Escherichia coli*-Stämme**

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
DH5α	F <sup>λ</sup> supE44 Δ(argF-lac) U169 φ80lacZΔM15hsdR17 recA1 endA1 gyr96 thi-1 relA1	Hanahan (1983)
TG2	F <sup>-</sup> traD36 lacI <sup>f</sup> Δ(lacZ)M15 proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> /supE hsdΔ5 thi Δ(lac-pro) Δ(srl-recA)306::Tn10 (Tet <sup>r</sup> )	Sambrook (1998)
ER2655	F <sup>λ</sup> fhuA2[lon] ompT lacZ::T7genel gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R (mcr-73::miniTn10 TetS) 2 R(zgb-210::Tn10) (TetS) endA1 [d cm]	NEB

**Tab. 9 *Bacillus subtilis*-Stämme**

Stamm	relevanter Genotyp	Elter	Konstruktion	Resistenz	Referenz
PY22	trpC2	168			Youngman (Universität Georgia)
168	trpC2				Hecker (Universität)

BSM21	<i>trpC2 rsbU::kan</i>	168	TF 168 mit chDNA aus BSA70; Sel: Km <sup>R</sup> Screen: PCR chDNA und "Southern"	Km <sup>R</sup>	Greifswald) Völker (2000)
BSM22	<i>trpC2 rsbU::kan rsbV312</i>	168	TF 168 mit chDNA aus BSA73; Sel: Km <sup>R</sup> ; Screen: PCR chDNA und Test mit <i>EcoRI</i> , dass <i>rsbV312</i> -Mutation inseriert war; Test auf <i>rsbV</i> -Mutation durch "Southern"	Km <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Völker (2000)
BSM24	<i>trpC2 rsbV312 rsbX::pWH25</i>	168	TF 168 mit chDNA aus BSA158; Sel: Spc <sup>R</sup> ; Screen: PCR chDNA und "Southern"	Spc <sup>R</sup>	Benson & Haldenwang (1992)
BSM29	<i>trpC2 sigB::spc</i>	168	TF 168 mit chDNA aus BSM14, Sel: Spc <sup>R</sup> ; Screen: PCR chDNA und "Southern "	Spc <sup>R</sup>	Völker (2000)
BSM30	<i>trpC2 rsbP::spc</i>	168		Spc <sup>R</sup>	Brigulla (1999)
GH01	<i>yqeT::cat</i>	1012	Abkömmling vom 1012	Cm <sup>R</sup>	Homuth et al. 1997
GH02	<i>yqeU::cat</i>	1012	Abkömmling vom 1012	Cm <sup>R</sup>	Homuth et al. 1997
GH03	<i>yqeV::cat</i>	1012	Abkömmling vom 1012	Cm <sup>R</sup>	Homuth et al. 1997
BSM 148	<i>dnaJ::cat</i>	1012	Abkömmling vom 1012	Cm <sup>R</sup>	Schumann, Universität Bayreuth (2001)
BSM149	<i>trpC2 rsbU::kan rsbP::spc</i>	168	TF BSM21 mit chDNA aus BSM30	Km <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM150	<i>trpC2 rsbP::spc rsbU::kan rsbV312</i>	168	TF BSM22 mit chDNA aus BSM30 Sel: Spc <sup>R</sup> ; Screen: Km <sup>R</sup> ; Test auf <i>rsbV</i> -Mutation durch "Western"	Km <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM151	<i>trpC2 SPβ ctc::lacZ</i>	168	TF 168 mit chDNA aus BSA46 Sel: Cm <sup>R</sup> ; Screen: Em <sup>R</sup>	Cm <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM152	<i>dnaJ::cat</i>	1012	TF 168 mit chDNA aus BSM148 Sel: Cm <sup>R</sup>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM153	<i>trpC2 rsbP::spc rsbU::kan SPβ ctc::lacZ</i>	168	TF BSM149 mit chDNA aus BSA46 Sel: Cm <sup>R</sup> ; Screen: Spc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> Test auf <i>rsU</i> -Mutation durch "Western"	Spc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM154	<i>trpC2 rsbU::kan SPβ ctc::lacZ</i>	168	TF BSM21 mit chDNA aus BSA46 Sel: Cm <sup>R</sup> ; Screen: Km <sup>R</sup> ; Em <sup>R</sup> ; Test auf <i>rsU</i> -Mutation durch "Western"	Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM155	<i>trpC2 rsbV312 rsb X ::pWH25 SPβ ctc::lacZ</i>	168	TF BSM24 mit chDNA aus BSA46 Sel: Cm <sup>R</sup> ; Screen: Spc <sup>R</sup> ; Em <sup>R</sup> ; Test auf <i>rsbV</i> -Mutation durch "Western"	Spc <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM156	<i>trpC2 sigB::spc SPβ ctc::lacZ</i>	168	TF BSM29 mit chDNA aus BSA46 Sel: Cm <sup>R</sup> ; Screen: Spc <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> ; Test auf <i>sigB</i> -Mutation durch "Western"	Spc <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM157	<i>trpC rsbU::kan rsbV312 rsb X ::pWH25 SPβ ctc::lacZ</i>	168	TF BSM154 mit chDNA aus BSM24 Sel: Cm <sup>R</sup> ; Screen: Km <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> ; Test auf <i>rsbUV</i> -Mutation durch "Western"	Km <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM158	<i>trpC2 rsbP::spc rsbU::kan rsbV312 rsb X ::pWH25</i>	168	TF BSM157 mit chDNA aus BSA46 Sel: Cm <sup>R</sup> ; Screen: Km <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> ; Test auf <i>rsbUV</i> -Mutation durch "Western", Test auf	Km <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit

BSM159	SPβ <i>ctc::lacZ</i> <i>trpC2 rsbP::spc</i> SPβ <i>ctc::lacZ</i>	168	<i>rsbP</i> -Mutation durch "Western" und Wachstumsexperimente TF BSM30 mit chDNA BSA46 Sel: Cm <sup>R</sup> ; Screen: Spc <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> , Test auf <i>rsbP</i> -Mutation durch "Western" und Wachstumsexperimente	Spc <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM160	<i>trpC2 yqeU::cat</i>	168	TF 168 mit chDNA aus GH02 Sel: Cm <sup>R</sup>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM161	<i>trpC2 yqeT::cat</i>	168	TF 168 mit chDNA aus GH01 Sel: Cm <sup>R</sup>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM162	<i>trpC2 yqeV::cat</i>	168	TF 168 mit chDNA aus GH03 Sel: Cm <sup>R</sup>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
BSM163	<i>trpC2 dnaJ::cat</i> V312 <i>rsbX::pWH25</i>	168	TF 168 mit chDNA aus BSA159 Sel: Spc <sup>R</sup> ; Screen: Cm <sup>R</sup> , Test auf <i>rsbV</i> -Mutation durch "Western"	Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	diese Arbeit

### 3.1.9. Plasmide

**Tab. 10 Plasmide**

Plasmid	Ausgangsvektor	Relev. Genotyp/ Resistenz	Konstruktion/ Bemerkungen	Referenz
pASK-IBA3	pDG364	C-term- <i>Strep</i> -tag- Fusion, Amp <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> - Überexpressionsvektor	IBA
pSweet		<i>Xyl</i> RP <sub><i>Xyl</i></sub> :mcs, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>AmyE</i> -Integrationsvektor mit Xylose-regulierbarem Promotor	Bhavsar et al. 2001
pML7		<i>sigB</i> , <i>rsbW</i> , <i>rsbV</i> , <i>rsbX</i>	Template für PCR von <i>sigB</i> , <i>rsbW</i> , <i>rsbV</i>	Binnie et al. 1986
pAR10	pASK-IBA3	<i>sigB</i> - <i>Strep</i> -tag- Fusion	Überexpression von SigB- <i>Strep</i> -tag	diese Arbeit
pAR11	pASK-IBA3	<i>rsbV</i> - <i>Strep</i> -tag- Fusion	Überexpression von RsbV- <i>Strep</i> -tag	diese Arbeit
pAR12	pASK-IBA3	<i>rsbW</i> - <i>Strep</i> -tag- Fusion	Überexpression von RsbW- <i>Strep</i> -tag	diese Arbeit
pAR19	pSweet	<i>rsbW-sigB</i> - <i>Strep</i> - tag-Fusion	Überexpression von SigB- RsbW- <i>Strep</i> -tag	diese Arbeit

### 3.1.10. Oligonukleotide

**Tab. 11 Oligonukleotide**

Oligo	Sequenz	Verwendung
SigB3	GAGAGAGGTCTCAGCGCTCATTAACCTCATCGAGGG	Ampl. von <i>sigB</i>
SigB5	GAGAGAGGTCTCAAATGACACAACCATCAAAAAC	Ampl. von <i>sigB</i>
RsbWiba3	GAGAGAGGTCTCAGCGCTGTTAGTTTCGTAGTTTTTGAT	Ampl. von <i>rsbW</i>
RsbWiba5	GAGAGAGGTCTCAAATGAAGAATAATGCTGATTAC	Ampl. von <i>rsbW</i>
RsbViba3	GAGAGAGGTCTCAGCGCTTTGCACTCCACCTTCTGA	Ampl. von <i>rsbV</i>
RsbViba5	GAGAGAGGTCTCAAATGAATATAAATGTTGATGTGA	Ampl. von <i>rsbV</i>
Sweet-RsbW- Cstrep5	GAGAGATTAATTAAGGACATCATTGATATTTCT	Ampl. von <i>rsbW</i> - <i>sigB</i> - <i>Strep</i> -tag
Sweet-SigB- Nstrep3	GAGAGAGGATCCTTATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCA AGCGCTCATTAACCTCATCGAGGG	Ampl. von <i>rsbW</i> - <i>sigB</i> - <i>Strep</i> -tag
IBA 3 fwd	AAAAAAGGTCTCCAATGCGACATAGCGTACTTTTTGC	Sequenzierprimer
IBA 3 rev	AAAAAAGGTCTCAGCGCTCTTCTGCGCTGCCAGCGCCTC	Sequenzierprimer

## **3.2. Methoden**

### 3.2.1. Medien und Wachstumsbedingungen

#### 3.2.1.1. Sterilisation

Medien wurden bei 1,2 Bar Überdruck, 121°C autoklaviert. Die Ausgleichszeit für 1 l betrug 20 min. Glasgeräte wurden im Trockenschrank für drei Stunden bei 180°C sterilisiert. Glukose und Spurenelemente wurden nach Abkühlung auf 50°C steril zugegeben.

#### 3.2.1.2. Vollmedien

Das verwendete Fertigmedien war Luria-Bertani-Medium (LB). Für die Herstellung fester Medien wurden 15 g/l Agar zugegeben. *E. coli* wurde nach der Elektroporation in SOC-Medium inkubiert. *B. subtilis* wurde zur Stammhaltung auf DSM-Platten ausgestrichen. Für das Gießen von DSM-Platten wurde das Medium auf 60°C abgekühlt.

Tab. 12 Medium für *E. coli*-Transformation

SOC		Supplemente für 1 l Soc	
Bacto Tryptone	20 g	2 M MgSO <sub>4</sub>	10 ml
Bacto Yeast Extract	5 g	2 M Glukose	10 ml
NaCl	0,58 g		
KCl	0,1 g		
Seradest	ad. 1 l		

Tab. 13 Medium zur Haltung von *B. subtilis* auf Platten

DSM (Difco Sporulationsmedium)		Supplemente für 0,4 l DSM	
Nutrient Broth	8 g	1 mM MnCl <sub>2</sub>	0,4 ml
KCl	1 g	0,1 mM FeSO <sub>4</sub>	0,4 ml
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g	100 mM CaCl <sub>2</sub>	0,4 ml
Seradest	ad. 1 l		

### 3.2.1.3. Minimalmedien

Tab. 14 Zusammensetzung: 1x SMM

5x SMS		100x Spurenelemente		5x SMM + Spurenelemente	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g	CaCl <sub>2</sub>	55 mg	5x SMS	475 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14 g	FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	135 mg	Spurenelemente	25 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	10 mg	<b>1x SMM supplementiert</b>	
Na <sub>3</sub> -Citrat x 2 H <sub>2</sub> O	1 g	ZnCl <sub>2</sub>	17 mg		
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g	CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4,3 mg	5x SMM	20 ml
Seradest	ad. 1 l	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	6 mg	20% Glukose	2,5 ml
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	6 mg	5 mg/ml Tryptophan	0,4 ml
		Seradest	100 ml	Seradest	ad. 100 ml
		-In dieser Reihenfolge lösen und sterilfiltrieren.			

### 3.2.1.4. Stammhaltung

Für den täglichen Laborbedarf wurde *E. coli* monatlich auf frische LB-Platten, gegebenenfalls mit Antibiotika, übertragen. Zur Stammhaltung von *B. subtilis* wurden DSM-Agarplatten verwendet, weil *B. subtilis* auf diesem Medium sporuliert und über Monate haltbar war.

*E. coli*-Platten wurden nach Inkubation bei 4°C gelagert. *B. subtilis*-Platten wurden bei RT aufbewahrt. Von allen verwendeten Stämmen wurden Glycerinkulturen zur Langzeithaltung bei -70°C gelagert. Dazu wurde 1 ml einer frischen Kultur in der exponentiellen Phase mit 1 ml in 50%igem Glycerin gemischt und eingefroren.

Die Reinheit der Kulturen wurde mikroskopisch, aufgrund der Koloniemorphologie und durch Überprüfung ihrer Plasmide und anderer genetischer Marker (z.B. Resistenzen) sichergestellt.



### 3.2.1.5. Medienzusätze und deren Konzentrationen

**Tab. 15 Medienzusätze**

<b>Substanz</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonz.</b>	<b>Lösungsmittel</b>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	Seradest
Chloramphenicol	5 mg/ml	5 µg/ml	96% Ethanol
Chloramphenicol*	500 mg/ml	50 µg/ml	96% Ethanol
Erythromycin	10 µg/ml	1 µg/ml	96% Ethanol
Kanamycin	20 mg/ml	20 µg/ml	Seradest
Kanamycin**	5 mg/ml	5 µg/ml	Seradest
Spektinomycin	50 mg/ml	200 µg/ml	Seradest
AHT	2 mg/ml	0,2 µg/ml	Dimethylformamid

\* Cm-Konzentration bei Experimenten, wo die Proteinbiosynthese abgestoppt werden sollte

\*\* Km-Konzentration für LB-Platten

### 3.2.1.6. Wachstum, Kultivierungs- und Stressbedingungen

Vorkulturen wurden im Erlenmeyerkolben bei 37°C unter ständigem Schütteln (200 rpm) kultiviert oder in Röhrchen auf dem Roller angezogen. Antibiotika wurden in den oben genannten Konzentrationen bei Bedarf zugegeben. Zur Durchführung der eigentlichen Versuche wurden vorgewärmte Medien auf OD<sub>540</sub> zwischen 0,05 und 0,1 angeimpft. Im Einzelnen wurden die Bakterienkulturen folgenden Behandlungen unterzogen: Die Endkonzentration bei Ethanolstress betrug 4% und bei Salzstress 3%. Der Salzstress wurde mit einer 4 M NaCl-Stammlösung eingestellt. Hitzestress wurde bei einer Endtemperatur von 48°C gesetzt. Kulturmengen bis 200 ml wurden in vorgewärmte Kolben in ein 48°C-Wasserbad umgesetzt. Größere Mengen wurden in dem 48°C-Bad mit 68°C-warmen Medium verdünnt, um die gewünschte Temperatur schnell einzustellen. Kältestress wurde zur Abgrenzung von „Kälteschock“ „Wachstum in der Kälte“ genannt und bei 15°C bzw. 16°C durchgeführt.

### 3.2.1.7. Wachstum in der Kälte

Zur Untersuchung des Kältewachstums wurden die verschiedenen Bacillusmutanten in supplementiertem SMM bei 16°C und 200 rpm im Schüttelinkubator (New Brunswick) kultiviert, wobei das Kolbenvolumen mindestens dreifach größer war als das Kulturvolumen, um O<sub>2</sub>-Mangel zu vermeiden. Das Minimalmedium SMM wurde verwendet, um in demselben Medium zu arbeiten, welches für vorangegangene Kältestudien eingesetzt wurde. Bei der für das Experiment bestimmten Kultur wurde auf die Verwendung von Antibiotika verzichtet. Für die Übernachtskultur wurden 20 ml SMM in 100 ml-Kolben mit einer Kolonie von einer

frischen LB-Platte beimpft. Die Übernachtskulturen wurden in Anwesenheit von Antibiotika wachsen gelassen. Morgens wurde aus dieser Kultur, welche eine  $OD_{540} < 2$  haben sollte (garantierte eine kurze Lag-Phase), eine Übertag (ÜT)-Vorkultur auf  $OD_{540}$  von 0,1 angeimpft und bis  $OD_{540}$  0,5 bei 37°C geschüttelt. Danach wurde diese Kultur auf  $OD_{540}$  0,1 verdünnt und bei 16°C weiter inkubiert. Der Zeitpunkt des Umsetzens wurde in allen folgenden Experimenten als  $t_0$  angesehen.

#### 3.2.1.8. Stabilitätsuntersuchungen in der Kälte

Um die Stabilität von RsbV, RsbW und SigB im WT 168 bei Kälte zu untersuchen, wurden zu einer 16°C-Kultur, welche auf  $OD_{540}$  0,12 angeimpft worden war, bei einer OD von 0,8 50 µg/ml EK Chloramphenicol gegeben. Die hochkonzentrierte Dosis an Chloramphenicol brachte die Proteinbiosynthese und damit das Wachstum zum Erliegen. Der Zeitpunkt der Antibiotikagabe wurde als  $t_0$  angesehen. Es wurden 200 ml Proben für die Western-Blot-Analyse bei 0, 1, 2, 3, 4, 6 und 8 h geerntet.

#### 3.2.1.9. Ernte und Aufschluss

Die Kulturen wurden in zur Hälfte mit Eis gefüllten Bechern geerntet, um die Produktion von Stressproteinen während der Ernte zu vermeiden. Nach dem Zentrifugieren (15 min, 4°C, 6000 rpm, SLA3000-Rotor) wurde das Pellet in GF-Puffer (mit PMSF-Zusatz als Proteaseinhibitor) gewaschen. Das Waschpuffervolumen betrug 5% des Kulturvolumens. Nach dem Rezentrifugieren wurde das Pellet in 1-5 ml desselben Puffers resuspendiert und durch Ultraschall (4x 20 sek mit je 2 min Pause) aufgeschlossen. Die Proben wurden nach der Proteinbestimmung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

**Tab. 16 Gelfiltrations-Puffer**

Komponente	Endkonz.
Tris/HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT	3 mM
NaCl	50 mM
PMSF in abs. Ethanol	17,2 mM

### **3.2.2. Molekularbiologische und genetische Standardmethoden**

#### **3.2.2.1. Präparation von Plasmid-DNA**

Die Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* mittels der von Birnboim (1979) beschriebenen „alkalischen Lyse“ in abgewandelter Form extrahiert. Die chromosomale DNA wird dabei denaturiert und fällt mit den Proteinen aus. Nach anschließender Neutralisation kann die überspiralisierte Plasmid-DNA isoliert werden.

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (10000 rpm, 3 min, 4°C), in 200 µl Lösung I resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 400 µl frisch hergestellte Lösung II (alkalische Lyse) zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde klar und viscos. Durch kurzes Mixen wurde mit 300 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>-Acetat pH 7,8 neutralisiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Mischung zentrifugiert (15000 rpm, 4°C, 15 min). Der klare Überstand wurde ohne Flocken in ein neues Eppendorfcup überführt und mit 0,6 Vol Isopropanol für 10 min gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 15000 rpm, 4°C) wurde der Überstand vollständig entfernt. Das durchsichtige Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und dann 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde in der Speed-Vac getrocknet, anschließend in 30 µl TE-Puffer mit 1 µl 1:10 verdünnter RNase aufgenommen und bei -20°C gelagert.

**Tab. 17 Lösungen für die Minipräparation von Plasmiden**

Lösung I		Lösung II (alkalische Lyse)	
Glukose	50 mM	NaOH	0,2 N
Tris/HCl pH 8,0	25 mM	SDS	1%
EDTA	10 mM	-frisch angesetzt	
Lysozym	0,4%		

**Tab. 18 Aufnahmepuffer für DNA: TE-Puffer**

Komponente	Endkonz.
Tris/HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

#### **3.2.2.2. Reinigung von PCR-Produkten und DNA aus dem Gel**

Die Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Banden aus dem Gel wurde nach einem Protokoll von Promega durchgeführt. Dazu wurden Wizard-Minisäulen von Promega und Diatomeenerde von Sigma verwendet.

Die wäßrige Phase aus dem PCR-Ansatz (50-100 µl) wurde in ein sauberes Eppendorfcup überführt und mit 100 µl „Direct Purification Buffer“ versetzt und gründlich gevortext. Dazu wurde 1 ml Diatomeenerderesin pipettiert und die Mischung 3x über 1 min verteilt gevortext. Wenn DNA aus einem Gel gereinigt werden sollte, so wurde die DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein Eppendorfcup aufgenommen und bei 70°C inkubiert, bis die Agarose geschmolzen war. Zu 300 µl Agarose wurden 1 ml Diatomeenerderesin pipettiert, 20 sek gevortext und dann in eine 2 ml-Spritze überführt, welche auf ein Promegasäulchen aufgesteckt war. Das DNA-Resin-Gemisch wurde langsam durch die Säule gedrückt. Danach wurde die Säule mit 2 ml 80% Isopropanol gewaschen. Das Säulchen wurde auf ein Eppendorfcup gesteckt und 2 x 2 min bei 10000 rpm getrocknet. Zur Elution der DNA wurden 50 µl TE-Puffer dazu pipettiert und das Säulchen für maximal 30 min zu 37°C gestellt. Das Säulchen wurde zur Elution der DNA auf ein neues Eppendorfcup überführt und 20 sek bei 10000 rpm zentrifugiert. Die erhaltene DNA konnte sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert werden.

**Tab. 19 Gelreinigung von DNA**

Resin		Merlin III		Direct Purification Buffer	
Guanidin-Hydrochlorid	66,84 g	Kaliumacetat Essigsäure Seradest	1,32 M 35,7 ml ad 500 ml	KCl	50 mM
Merlin III	33,3 ml			Tris/HCl pH 8,8	10 mM
Seradest	ad 100 ml			MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
pH 5,5 einstellen und filtrieren				Triton X-100	0,1%
+ Diatomeenerderesin	2%				

### 3.2.2.3. Restriktion von DNA

Für Klonierungen wurden Plasmide mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 15-20 µl in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer angesetzt und bei einer Temperatur von 37°C für 2 h inkubiert. *Bsal* war eine Ausnahme und wurde bei 55°C inkubiert. Bei Doppelverdaus wurde der Puffer so gewählt, dass beide Enzyme mindestens zu 75% schneiden konnten. War das nicht möglich, wurden die Verdaue nacheinander durchgeführt, wobei als erstes das Enzym mit dem niedrigeren Salzgehalt schnitt und nach dem Umpuffern des Ansatzes das zweite Enzym eingesetzt wurde. Pro µg DNA wurde mindestens eine Enzymeinheit eingesetzt. Die vollständige Restriktion wurde im Agarosegel (0,8-1%) überprüft.

### 3.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde zur Kontrolle und Größenbestimmung in 0,8-1,5%igen ethidiumbromidhaltigen TBE-Agarosegelen (Sambrook et al. 1989) aufgetrennt. Dabei war der Farbstoff Ethidiumbromid in das Gel eingegossen worden. Die Proben wurden mit sechsfach konzentriertem Ladepuffer versetzt, der Ficoll 400 zum Beschweren der Probe enthielt. Außerdem waren Farbstoffe enthalten, um den Elektrophoreselauf zu verfolgen. Als Größenmarker wurde der 1 kb Ladder von Gibco genutzt. Für die Größenabschätzung ungeschnittener Plasmide wurden Plasmide bekannter Größe eingesetzt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines Videoprinters (Biotec-Fischer) unter UV-Licht bei 302 nm.

**Tab. 20 10x TBE-Puffer, Laufpuffer für die DNA-Elektrophorese**

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
Tris/HCl pH 8	108 g/l	900 mM
Borsäure	55 g/l	900 mM
0,5 M EDTA	40 ml/l	10 mM
Seradest	ad. 1 l	

**Tab. 21 6x Ladepuffer für DNA-Elektrophorese**

Komponente	Menge/Vol
Bromphenolblau	0,25%
Xylen-Cyanol FF	0,25%
Ficoll 400	15%

### 3.2.2.5. Ligation von DNA

Bei der Klonierung wurden der linearisierte Vektor und das Insert miteinander ligiert. Die Ligation wurde mit der T4-Ligase über Nacht bei 16°C in Ligationspuffer durchgeführt. Zur Erhöhung der Frequenz rekombinanter Plasmide wurde der Vektor für 1 h bei 37°C mit alkalischer Phosphatase behandelt.

### 3.2.2.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Sequenz von *sigB*, *rsbW* und *rsbV* wurde über PCR mit dem Plasmid pML7 als Template amplifiziert. Chromosomale DNA wurde nicht als Template eingesetzt, weil sie bei Verwendung der Pfu-Polymerase weniger Produkt als Plasmid-DNA lieferte. Die PCR wurde im Thermocycler (Progene) mit der Pfu-Polymerase durchgeführt, welche eine „proof-

reading“-Funktion besitzt und Produkte ohne ein zusätzliches terminales 3`-A liefert. Die PCR wurde entsprechend dem PCR-Standardprotokoll nach White (1993) durchgeführt.

#### Primer für pASK-iba3-Klonierung

Für die Klonierung wurden die von IBA vorgegebenen Primer verwendet, welche das PCR-Produkt beidseitig mit einer *BsaI*-Stelle versehen. Die Primer wurden entsprechend der Herstellerangaben um etwa 20 zur Sequenz komplementäre Nukleotide verlängert.

#### Primer für pSweet-Klonierung

Für die *rsbW-sigB-Strep*-tag-Klonierung wurde die *Strep*-tag-Sequenz durch den C-terminalen Primer angehängt. Außerdem wurden durch die Primer eine *Bam*HI (N-terminal) und eine *PacI*-Stelle (C-terminal)eingebracht.

Die Annealingtemperatur ( $T_a$ ) wurde für jeden Primer mit der folgenden Formel abgeschätzt:

$$T_a (^{\circ}\text{C}) = 2x (A + T) + 4x (G + C) - 5^{\circ}\text{C}$$

**Tab. 22 PCR-Ansatz**

Reagenzien/Stammlösung	Ansatz	Endkonz.
10x Reaktionspuffer	10 µl	200 µM
dNTP (je 10 mM)	2 µl	
Template	2 µl	
10 µM Primer vorwärts	5 µl	500 nM
10 µM Primer rückwärts	5 µl	500 nM
Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	2 µl	
Seradest	ad. 100 µl	

-mit 50 µl Mineralöl überschichtet

**Tab. 23 PCR-Programm**

	Temp.	Zyklus	Dauer	Zweck
1	95°C	1	5 min	Denaturierung dsDNA
2	49-55°C	30	1 min	Primerannealing
3	72°C		2,5 min/kb	Elongation
4	92°C		1 min	Denaturierung
5	72°C	1	10 min	Aufbewahrung
6	4°C	1	24 h	

### 3.2.2.7. Fluoreszenzbasierte Sequenzierung mit dem Licor-Sequenzierer

#### 1) Probenvorbereitung

Die Amplifikation der zu sequenzierenden DNA wurde unter Nutzung eines Kits von Amersham Pharmacia Biotech, welcher die thermostabile Polymerase, die Nukleotide und den Stop-Puffer enthielt, entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die

verwendeten Primer waren fluoreszenzmarkiert. Pro Spur wurden 1,2 µl Probe auf das Gel aufgetragen.

**Tab. 24 Pipettierschema**

Komponente	
DNA (pro kb 0,5-1 µg DNA/ 2 pmol/µl)	X µl
Primer	0,5 µl
Seradest	ad. 13 µl
-Von dem Mix je 3 µl in jedes Reaktionscup pipettieren	
und je Cup 1 µl Nukleotidmix (A,C,G oder T) dazu pipettieren	
-mit 20 µl Mineralöl überschichten	

**Tab. 25 PCR-Programm für die Sequenzierung**

	Temp.	Zyklus	Dauer
1	95°C	1	3 min
2	95°C	30	20 sek
3	60°C		30 sek
4	70°C		40 sek
5	95°C	15	20 sek
6	70°C		30 sek
5	70°C	1	5 min
7	75°C	1	10 min
8	4°C	1	24 h

-Anschließend in jedes Eppendorfcup 3 µl Stop-Puffer geben

## 2) Gießen des Sequenziergels

Die Glasplatten wurden sehr gründlich abgewaschen und mit 70% Ethanol abgerieben, um vollständig saubere Platten zu erhalten. Die Spacer wurden auf die „Glasplatten ohne Ohren“ gelegt. Dann wurde die Gegenplatte aufgelegt und unter gleichmäßigem Festziehen in die Halterung eingespannt. Das Gel wurde langsam eingegossen. Luftblasen wurden durch Klopfen entfernt. Die Befestigungsvorrichtung für den Vorkamm wurde mittig eingeschoben, der Vorkamm eingesetzt und alles festgeschraubt. Das Gel musste mindestens eine Stunde polymerisieren. Das Gel wurde in die Halterung des Sequenzers eingesetzt. Dann wurde der Vorkamm herausgezogen. Gelreste wurden mit einer Spritzflasche vorsichtig entfernt, der Probenauftragskamm eingesetzt und die Proben appliziert. Die Glasplatten wurde im Bereich des Laser-Lesebereichs noch einmal geputzt, bevor der Gellauf gestartet wurde.

**Tab. 26 Sequenzgel**

Komponente	Vol
Sequagel XR ultra pure (Acrylamidmix)	30 ml
Sequagel complete ultra pure (Temedmix)	7,5 ml
10% APS	270 µl

### 3.2.2.8. Transformation von *E. coli* mit $\text{Ca}^{2+}$ -kompetenten-Zellen (Kushner 1978)

Plasmide wurden mit der  $\text{CaCl}_2$ -Methode oder durch Elektroporation in *E. coli* eingeführt. Die  $\text{CaCl}_2$ -Methode basiert darauf, dass die Zellen in einer Lösung von MOPS,  $\text{CaCl}_2$  und RbCl gewaschen und dann kurz einem Hitzeschock ausgesetzt werden. Als Mechanismus vermutet man Veränderungen in der Zelloberfläche, die eine DNA-Aufnahme erleichtern.

Für die Herstellung  $\text{CaCl}_2$ -kompetenter DH5 $\alpha$ -Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 0,2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei OD<sub>540</sub> 0,8 geerntet. Nach 5 min im Eisbad wurde zentrifugiert (10 min, 8000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml Lösung I resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 20 ml Lösung II aufgenommen und 30 min im Eisbad inkubiert. Der Schritt wurde wiederholt, nur dass das Pellet in 5 ml Lösung II resuspendiert wurde. Die Zellen wurden zur Erhöhung der Effektivität der Transformation 1-2 h im Eisbad stengelassen. Die Zellen konnten eine Woche im Eisbad bei 4°C aufbewahrt werden. Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen mit 1-20 µl DNA oder Ligationsansatz 30 min im Eisbad inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock (43°C, 90 sek) ausgesetzt. Die Zellen wurden in 1 ml LB aufgenommen, 1h bei 37°C geschüttelt und dann 100 µl davon auf Selektivplatten plattiert.

**Tab. 27 Lösungen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Transformation von *E. coli***

Lösung I		Lösung II	
MOPS pH 7,0	10 mM	MOPS pH 6,5	100 mM
RbCl	10 mM	$\text{CaCl}_2$	50 mM
		RbCl	10 mM

### 3.2.2.9. Transformation von elektrokompenten *E. coli*-Zellen (Hanahan et al. 1991)

Bei der Elektroporation werden die TG2-Zellen kurzzeitig einer hohen elektrischen Spannung ausgesetzt, wobei sich wahrscheinlich Poren in der Zellwand bilden, welche eine erleichterte Aufnahme von DNA erlauben.

Um kompetente Zellen herzustellen, wurden 500 ml einer exponentiellen Kultur abzentrifugiert und in vier Schritten (1 Vol, ½ Vol, ¼ Vol und 1/50 Vol) mit 10% Glycerol gewaschen. Dazwischen wurde jeweils bei 4°C für 10 min bei 4000 rpm (SLA-3000-Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 10%igem Glycerin aufgenommen, sofort eingesetzt oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.



Zur Elektroporation wurden Küvetten mit einem 0,1 cm großen Elektrodenspalt von Biorad verwendet. Es wurden 40 µl Zellen und 1 µl Ligationsmix in eine eisgekühlte Küvette pipettiert und sofort im Elektroporationsgerät bei 1.8 kV, 25 µF und 200 Ω elektroporiert. Die Zeitkonstante sollte zwischen 4,0 bis 4,5 liegen. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1h bei 37°C geschüttelt. Es wurden 100 µl je LB-Platte mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz ausplattiert. Als Negativkontrolle wurde Wasser statt des Ligationsmixes eingesetzt und als Positivkontrolle diente ein Standardvektor ohne Insert.

### 3.2.2.10. Isolation von chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Aus einer LB-ÜK wurden 1,5 ml Zellen durch Zentrifugation bei 10000 rpm, 5 min, 4°C geerntet, in 200 µl Puffer 1 resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Puffer 2 wurde bei RT 1-2 h auf dem Taumelschüttler inkubiert. Es wurden 600 µl Phenol (mit 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 gesättigt) hinzugegeben und für weitere 1-2 h auf dem Taumelschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation (10000 rpm, 5 min, 4°C) wurde die wässrige, die DNA enthaltende Phase, mit einer abgeschnittenen blauen Spitze in ein neues Eppendorfcup überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 2 Vol 96%igem, eiskaltem Ethanol und vorsichtiges Mischen auf Eis gefällt. Der stecknadelkopfgroße DNA-Klumpen wurde in ein weiteres Eppendorfcup überführt, 20 min bei RT getrocknet und anschließend in 100 µl Seradest aufgenommen, in welchem sich das Pellet UN löste. Die chromosomale DNA wurde bei 4°C gelagert, um Scherkräfte beim Auftauen zu vermeiden.

**Tab. 28 Puffer zur Isolation von chromosomaler DNA aus *B. subtilis***

Puffer 1			Puffer 2		
Komponente	Menge/Vol	Endkonz.	Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
0,5 M EDTA pH 8,0	2 ml	100 mM	1 M Tris/HCl pH 8,0	100 µl	10 mM
1 M Tris/HCl pH 8,0	1 ml	100 mM	5 M NaCl	200 µl	100 mM
Lysozym	50 mg	0,5%	10% SDS	1 ml	1%
Seradest	ad. 10 ml		Seradest	ad. 10 ml	

### 3.2.2.11. Transformation von *B. subtilis* nach Cutting & Vander (1990)

Für die Transformation von *B. subtilis* wurde die „High-salt (HS)-Low-salt (LS)“-Methode in modifizierter Form verwendet, welche die natürliche Kompetenz von *B. subtilis* ausnutzt.

Von einer frischen LB-Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit 3 ml HS- Medium angeimpft und bei 37°C UN auf dem Roller inkubiert. 20 ml vorgewärmtes LS-Medium

wurden mit 1 ml dieser HS-Kultur angeimpft und für 3 h bei 30°C und ca. 100 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die zu transformierende DNA in ein Eppendorfcup vorgelegt, je 1 ml LS-Kultur dazugegeben und 2 h bei 37°C auf dem Roller inkubiert. Dann wurden die Transformationsansätze 20 sek bei 13000 rpm ankonzentriert, ein Teil des Überstandes verworfen, das Zellpellet durch Fingerschnippen resuspendiert und auf LB-Selektivplatten ausplattiert.

**Tab. 29 Lösungen zur Transformation von *B. subtilis***

HS-Medium (100 ml)		LS-Medium (20 ml)	
5x SMS	10 ml	5x SMS	2 ml
20% Glukose	2,5 ml	20% Glukose	500 µl
5 mg/ml Tryptophan	1 ml	5 mg/ ml Tryptophan	20 µl
2% Casamino-säuren	1 ml	2% Casamino-säuren	100 µl
10% Hefeextrakt	1 ml	10% Hefeextrakt	200 µl
8% Arginin/0,4% Histidin	10 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>	50 µl
Seradest	ad 100 ml	Seradest	ad 20 ml
		-direkt vor Gebrauch ansetzen und sterilfiltrieren	

### 3.2.2.12. $\beta$ -Galaktosidase-Assay

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Assay ist ein gut etabliertes Reportergensystem. Dabei wurde das SigB-abhängige Gen *ctc* mit dem Gen der  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*) fusioniert und unter die Kontrolle eines SigB-regulierten Promotors gebracht. Bei Anschaltung von SigB wird das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase produziert. In dem unten beschriebenen, kolorimetrischen Assay wird die Aktivität des Enzyms anhand der Umsetzung von ONPG gemessen, welche in eine photometrisch messbare Gelbfärbung resultiert.

Der Kultur wurden 3 ml Probe steril entnommen. 1 ml Zellen wurden bei 4°C, 5 min, 15000 rpm geerntet, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20°C gelagert. Während der Zentrifugation wird von 1 ml-100 µl Probe in der entsprechenden Verdünnung die OD bei 540 nm bestimmt. Die eingefrorenen Pellets wurden unmittelbar vor Durchführung der Bestimmung in 800 µl Z-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Tuluol wurden die Zellen durch 2x 20 sek Vortexen (dazwischen 2 min Pause) permeabilisiert. Danach erfolgte eine 5 min-Inkubation bei RT. Die Reaktionen wurden im 10 Sekundentakt durch Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung gestartet. Die Start- und Endzeiten wurden notiert. Die Inkubation erfolgte im 37°C-Wasserbad bis zum Eintritt einer gut messbaren Gelbfärbung. Da bei den Kälteproben häufig eine zu schnelle Färbung eintrat, wurden diese Proben 1:10 in Z-Puffer verdünnt, gevortext und dann mit ONPG-Lösung gestartet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung im 15 Sekundentakt abgestoppt. Nach dem Abstoppen

aller Proben wurden die Zelltrümmer durch kurzes Zentrifugieren bei RT pelletiert. Die Farbtintensität des Überstandes wurde bei 420 nm bestimmt. Dabei diente das Assaypuffer-ONPG-Gemisch ohne Zellextrakt als Leerwert.

Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wird in Miller-Units angegeben:

$[1000 \times A_{420} / (\text{Zeit [min]} \times \text{Vol [ml]} \times A_{540\text{nm}})]$

**Tab. 30 Puffer zur Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität**

<b>Z-Puffer</b>		<b>ONPG-Lösung</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 mM	ONPG	4 mg/ml in Z-Puffer, frisch ansetzen
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	40 mM		
KCl	10 mM		
MgSO <sub>4</sub>	1 mM		
$\beta$ -Mercaptoethanol (frisch zugegeben)	50 mM	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung</b>	
		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 M in Seradest

-pH 7,0 einstellen, nicht autoklavieren, 4°C

### **3.2.3. Biochemische Methoden**

#### **3.2.3.1. Zellaufschluss**

Die Zellen wurden im Eisbad in GF-Puffer mit Ultraschall (4x 20 sek, 2 min Pause) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation (45 min, 4°C, 100000 g, Ti-75-Rotor [10 ml] oder EFT80.1 [2 ml], Kentron-UZ) abgetrennt. Die Rohextrakte wurden bei -20°C gelagert.

#### **3.2.3.2. Proteinfällung**

Für einige Anwendungen war es nötig größere Volumina zu fällen oder umzupuffern. Nach einer Proteinbestimmung wurde die entsprechende Menge Rohextrakt mit 2 Vol 99%igem, kaltem Ethanol versetzt, 30 min bei -80°C oder ÜN bei -20°C gefällt (15000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde kurz in der Speed Vac getrocknet und in 20  $\mu$ l Probenpuffer aufgenommen. Die Probe wurde entweder gleich auf ein Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

#### **3.2.3.3. Proteinbestimmung**

Die Bestimmung wurde nach Bradford (1976) mit dem Biorad-Proteinassay durchgeführt. Als Standard diente fertig gelöstes Rinderserumalbumin (1 mg/ml). Es wurden geeignete Proteinmengen mit 200  $\mu$ l Bradfordreagenz (ad. 1 ml Seradest) für 15 min inkubiert. Durch

Bindung von Protein an Coomassie-Brilliantblau wurde eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm induziert und dann bei der letztgenannten Wellenlänge bestimmt.

Zusätzlich wurde die Menge der gereinigten Proteine photometrisch bei 280 nm mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/pimamal-compo.pe>) der mit einem *Strep*-tag versehenen Proteine bestimmt, wobei die Bradford- und die photometrische Bestimmung gut übereinstimmten. Bei der Fluoreszenzmessung war zu beachten, dass die Proteinlösung kein Destiobiotin enthielt, da dieses die photometrische Messung beeinflusste.

**Tab. 31 verwendete Werte für Proteinbestimmung mittels Absorptionsmessung bei 280 nm**

Protein	molekulare Masse (Da)	Absorption bei 280 nm (1 mg/ml)
SigB- <i>Strep</i> -tag	30969,47	0,66
RsbW- <i>Strep</i> -tag	19192,38	0,987
RsbV- <i>Strep</i> -tag	13138,14	0,71

#### 3.2.3.4. Analyse der Komplexe mittels Gelfiltration

Zur Untersuchung der Komplexe von SigB, RsbW und RsbV in verschiedenen *Bacillus*-Rohextrakten wurde eine vorgepackte, präparative Gelfiltrationssäule (Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech) mit einem Bettvolumen von etwa 330 ml verwendet. Diese Säule erlaubte die angestrebte Auftrennung von 1,5 l Rohextrakt im Bereich von 440-13 kDa. Die Säule wurde mit einzelnen Molekulargewichtsstandards (Sigma) geeicht. Die Säule zeigte das erwartete Totvolumen von etwa 110 ml. Die Eichung reproduzierte das von Amersham Pharmacia Biotech vorgegebene Chromatogram und diente zur sicheren Zuordnung der Molekularmassen. Die Säule wurde ÜN mit GF-Puffer äquilibriert. Der eigentlichen Lauf wurde mit frisch hergestelltem GF-Puffer mit PMSF mit einer Flussrate 2 ml/min durchgeführt. PMSF ist in Flüssigkeiten nur kurze Zeit haltbar. Um eine möglichst definierte Auftrennung der Komplexe zu erreichen, betrug das Probenvolumen trotz der großen Proteinmenge nur 4 ml statt der maximal erlaubten 5 ml. Von 100 ml bis 330 ml wurde das Eluat in 5 ml-Fractionen gesammelt. Nach dem Lauf wurden 200 µl Aliquots gefällt. Der übrige Teil der Fractionen wurde für eventuelle spätere Analysen bei -20°C gelagert. Ebenfalls eingefroren wurde ein Aliquot des Rohextraktes. Zusammen mit Proben der einzelnen Fractionen wurde der Rohextrakt mit auf die Blots aufgetragen und diente für die Western-Blot-Analyse als Postivkontrolle für die Antikörperreaktion.

Für die Gelfiltration wurden drei 1,5 l *B. subtilis*-168-Wildtypkulturen in SMM gezogen. Je eine Kultur wurde bei 37°C/OD1 und 16°C/OD1 geerntet. Eine dritte Kultur wurde bei 37°C/OD0,8 mit 4% Ethanol gestresst und nach 10 min geerntet. Der Ethanolstress wurde nur für 10 min, statt wie in vorhergehenden Versuchen für 1 h gesetzt, um die Komplexbildung von SigB, RsbW und RsbV in der Phase maximaler SigB-Aktivität beobachten zu können. Die Zellen wurden nach der Ernte bei 4°C und 4500 rpm (SLA3000-Rotor, Sorvall-Zentrifuge) für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde 1x mit GF-Puffer gewaschen und bei -80°C gelagert.

### 3.2.3.5. Prinzip der Affinitätsreinigung über StrepTactin-Affinitätssäulen

Vektoren, Sepharose und AHT wurden von IBA, Göttingen bezogen. Die Expressionskassette steht unter der transkriptionellen Kontrolle des *tetA*-Promotor/Operators. Die effiziente Initiation der Translation wird durch die sich an den *tetA*-Promotor/Operator anschließende Tandem-Ribosomenbindestelle gewährleistet.

Die Expression wird durch Zugabe des Induktors Anhydrotetracyclin (AHT) in einem beliebigen *E.coli*-Stamm erreicht, da der *tetA*-Promotor/Operator keinen weiteren Regulationsmechanismen unterliegt. Die Reinigung des heterolog exprimierten Proteins erfolgt durch die Affinität eines an das Protein fusionierten Linkers (Ser-Ala) und des Aminosäure-Tags (NH<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-COOH) an immobilisierte StrepTactin-Sepharose, wobei es sich hier im Prinzip um eine abgeschwächte Biotin-Avidin-Bindung handelt. Nach Auftrag des Rohextraktes oder eines schon partiell gereinigten Extraktes auf die Säule, wird dieser durch Waschen mit ca. 10 Vol Puffer unter physiologischen Bedingungen vom Fusionsprotein abgetrennt. Die Elution erfolgt durch Zusatz eines kompetitiven Inhibitors, Destiobiotin, zum Puffer. Destiobiotin ist dabei im Überschuss vorhanden und verdrängt das getaggte Protein aus den Bindungsstellen, wodurch dieses nach ca. 1 Vol eluiert. Zur Regenerierung wird die Säule mit 15 Vol des Farbstoffs HABA gewaschen, welcher seinerseits nun Destiobiotin verdrängt. Die Farbe des Regenerierungspuffers schlägt im Fall von freien Bindungsstellen auf der Matrix von orange nach rot um. Dieser Farbumschlag zeigt sowohl den Regenerierungsprozess als auch den Aktivitätsstatus der StrepTactin-Säule an. Anschließend wird der Regenerierungspuffer mit mindestens 8 Vol (10 mM Tris, 2 mM EDTA) Puffer entfernt, die Säule mit 1 ml Puffer überschichtet und bei 4° gelagert.

### 3.2.3.6. Expression und Reinigung der Proteine SigB und RsbW

Die Expression erfolgte in ER2655, einem proteasedefizienten *E.coli*-Stamm, in LB mit 100 µg/ml Ampicillin bei 30°C mit 200 rpm. Die suboptimale Wachstumstemperatur erlaubte eine langsamere Expression, wodurch die Menge an löslichem Fusionsprotein erhöht werden konnte. Die Induktion der Zellen erfolgte mit 200 µg/l AHT bei einer OD<sub>540</sub> von 0,5 für 2,5-3 h. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 4500 rpm, SLA300-Rotor, Sorvall-Zentrifuge) geerntet, 1x mit GF-Puffer gewaschen und die Zellpellets bei -20°C gelagert. Die zur Reinigung verwendeten Puffer enthielten PMSF und EDTA als Proteasehemmer, da die zu reinigenden Proteine sonst partiell proteolytisch degradiert wurden. Die Reinigung wurde bei 4°C mit filtrierten Puffern durchgeführt.

Das Pellet von ca. 1,5 l Zellen wurde durch Ultraschall 4x 20 sek (je 2 min Pause) aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen in 4-7 ml Puffer B mit einer Spatelspitze MgSO<sub>4</sub> und DNase resuspendiert. Der das Fusionsprotein enthaltende Überstand wurde durch Ultrazentrifugation (Kentron) bei 100000 g im Ti-75-Rotor für 45 min bei 4°C von den Zelltrümmern abgetrennt. Der Überstand wurde auf die ebenfalls mit Puffer B äquilibrierte 5 ml-StrepTactin-Säule gegeben, wobei diese ohne Druck betrieben wurde. Für den Probenauftrag wurde die Säule am Auslauf mit einem dünnen Schlauch und einer Schlauchklemme versehen. Die Schlauchklemme verhinderte ein zu schnelles Durchlaufen des Rohextraktes beim Auftragen.

Die Säule wurde mit 13 Vol Puffer gewaschen, wobei die NaCl-Konzentration während des Waschens variierte, um ungewünschte Proteinbindungen zu zerstören. Die Elution erfolgte mit 2 Vol Puffer A ohne PMSF, dem Destiobiotin zugesetzt worden war, wobei das Fusionsprotein fast sauber im zweiten Volumen eluierte. Zur vollständigen Reinigung wurden sowohl SigB als auch RsbW über einen starken Anionentauscher (Resource Q [6 ml], vorgepackt von Amersham Pharmacia Biotech) mit einem linearen 50 mM (Puffer A)- 0,5 M (Puffer B)- NaCl-Salzgradienten über 120 ml mit einer Flußgeschwindigkeit von 3 ml/min gereinigt. SigB eluierte bei 250-300 mM NaCl und RsbW bei 350-400 mM NaCl in jeweils 10 ml. Für sehr sensible Anwendungen, wie Kristallisationsversuche, wurde die Reinigung noch um eine analytische Superdex 75-Gelfiltrationssäule (vorgepackt von Amersham Pharmacia Biotech) ergänzt. Die Proteine wurden in einer 10 ml Pall Filtron-Rührzelle auf 2 ml ankonzentriert und anschließend in 2 ml-Centricons auf ein geeignetes Volumen gebracht. Es wurden Filter mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa verwendet. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Proteine mit Entsalzersäulen (PD-10 von Amersham Pharmacia Biotech) in Lagerungspuffer umgepuffert, mit 1 Vol Glycerol versetzt und bei -20°C gelagert.

**Tab. 32 Basis der für die Proteinreinigung verwendeten Puffer (A, B, C, D)**

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
200 mM Hepes pH 7,5	100 ml	20 mM
2 M NaCl	Siehe Tab.33	
0,5 M EDTA pH 8,0	4 ml	2 mM
DTT	0,154 g	1 mM
PMSF (6 mg/ml)	5 ml	17,2 mM
pH 7,5 einstellen		
Seradest	ad. 1 l	
-Puffer filtrieren		

**Tab. 33 NaCl-Konzentrationen der verwendeten Puffer**

Puffer	2 M NaCl Vol/1 l	NaCl-Endkonz.
Puffer A	25 ml	50 mM NaCl
Puffer B	250 ml	0,5 M NaCl
Puffer C	500 ml	1 M NaCl
Puffer D	350 ml	0,7 M NaCl

**Tab. 34 2x Puffer zur Aufbewahrung der Proteine**

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
200 mM Hepes pH 7,5	50 ml	100 mM
2 M NaCl	15 ml	300 mM
0,5 M EDTA pH 8,0	200 µl	1 mM
DTT	30,8 mg	2 mM
PMSF (6 mg/ml)	5 ml	17,2 mM
pH 7,5 einstellen		
Seradest	ad. 100 ml	

-Puffer filtrieren

-Zur Proteinlagerung wird der Puffer 1:1 mit 100% Glycerol verdünnt.

**Tab. 35 Protokoll der Waschschritte während der Affinitätsreinigung**

Waschschritte	
M NaCl	Vol
0,5	3
0,05	2
1	2
0,05	2
0,5	2
0,05	2

**Tab. 36 Puffer zur Elution der Fusionsproteine**

Elutionspuffer
Puffer B und C mit 2,5 mM Destiobiotin ohne PMSF

### 3.2.3.7. Expression und Reinigung des Proteins RsbV

Die Expression von RsbV erfolgte wie für SigB und RsbW beschrieben. Bei der Reinigung von RsbV wurde der Affinitätssäule eine selbstgegossene 10 ml Q-Sepharose-Säule (Säule und Material von Amersham Pharmacia Biotech) vorgeschaltet. Dabei wurde der Rohextrakt in einem 250 ml-Gradienten von 50 mM (Puffer A)-0,7 M (Puffer D) aufgetrennt. RsbV eluierte bei 150-200 mM NaCl in ca. 9 ml. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und auf die StrepTactin-Säule gegeben, von welcher RsbV sauber eluierte. Die Waschschritte wurden wie angegeben durchgeführt. Abweichend vom obigen Protokoll wurde die Elution direkt in Aufbewahrungspuffer vorgenommen. Falls notwendig wurde das Protein in Centricons mit 3 kDa Ausschlussvolumen ankonzentriert, was aber nach Möglichkeit vermieden wurde, da RsbV zum Ausfallen auf der Membran neigte. RsbV wurde ebenfalls mit 1 Vol Glycerol versetzt und bei -20°C gelagert.

### 3.2.3.8. Komplexanalyse von SigB und RsbW durch Fluoreszenzmessung

Zur Analyse der Konformation des RsbW/SigB-Komplexes wurde das „Cary Eclipse“-Fluoreszenz-Spektrophotometer (Varian) verwendet. Prinzipiell wurde die Fluoreszenz der in der Proteinsequenz vorhandenen Tryptophane von SigB und RsbW bei 280 nm gemessen. Ein im äußeren Bereich des Proteins liegendes Tryptophan absorbiert anders, als ein durch Komplexbildung in den inneren Bereich verlagertes Tryptophan. Für die Messung wurde eine an zwei Seiten geschwärzte Quarzküvette verwendet. In der Küvette wurde die zu messende Proteinlösung durch dreimaliges vorsichtiges Plümpern gemischt. Zur Bestimmung der jeweiligen Tryptophanfluoreszenz der Einzelproteine wurden zunächst Eichreihen (Tab. 38) von SigB und RsbW aufgenommen. Danach wurde in einem neuen Ansatz ein Protein in der Küvette vorgelegt und der Bindungspartner schrittweise dazu pipettiert. Die Volumenzunahme in der Küvette wurde bei den sich anschließenden Berechnungen berücksichtigt. Die SigB/RsbW-Bindungsfluoreszenzen ergaben sich aus der Abnahme der Fluoreszenz bei Komplexbildung im Vergleich zu der Fluoreszenz der einzeln vorliegenden Proteine. Zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie wurden die erhaltenen Spektren im Bereich von 330-400 nm entsprechend der angegebenen Formel (Wassenberg et al. 1999) integriert.

$$F = F_0 + \Delta F / 2P_0 [(K_d + P_0 + L_0) - ((K_d + P_0 + L_0)^2 - 4P_0L_0)^{1/2}]$$

Am Spektrophotometer wurde folgende Einstellungen vorgegeben:



**Tab. 37 Einstellungen am Fluoreszenzphotometer**

Fluoreszenzphotometer	Einstellungen
Excitation	280 nm
Start	295 nm
Stop	550 nm
Spalt (Emission)	5
Spalt (Extinktion)	2,5
Geschwindigkeit	Medium
Modus	Overlay
Options	High

**Tab. 38 Pipettierschema der Eichreihen**

	µg/Küvette	µg Protein pro Zugabe	Proteinstocklösung
1	0,5 µg-5 µg	0,5 µg	0,1 mg/ml
2	6-10 µg	1,0 µg	0,2 mg/ml
3	15 µg-35 µg	5,0 µg	1,0 mg/ml

**Tab. 39 Puffer zur Fluoreszenzmessung**

Komponente	Endkonz.
200 mM Hepes pH 7,5	25 mM
0,5 M EDTA	0,5 mM
2 M NaCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
-Puffer filtriert	

### 3.2.3.9. SDS-PAGE (Laemmli 1970)

Das SDS-PAGE diente zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse. Es wurden 10%ige und 12,5%ige Gele verwendet. Die Auftrennung wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblaubande das untere Gelende erreicht hatte. Die Laufgeschwindigkeiten sind tabellarisch zusammengefasst. Als Marker wurde vorgefärbter Proteinmarker von MBI Fermentas eingesetzt. Von den Rohextrakten wurden pro Spur 60 µg Protein (1:1 in Probenpuffergemisch für 6 min bei 97°C denaturiert) aufgetragen. Die Gele wurden entweder über Nacht auf dem Gelschüttler in Färbelösung inkubiert und dann entfärbt bis die Proteinbanden gut sichtbar waren oder geblottet und die resultierenden Membranen mit Antikörpern detektiert.

**Tab. 40 Mengen und Zusammensetzung für 4 SDS-Midi-Gele (10x14 cm)**

12,5% SDS-Trenngel	Vol	Endkonz.	Sammelgel	Vol	Endkonz.
40% Acrylamid	34,1 ml	12,5%	40% Acrylamid	1,8 ml	3,6%
2% Bis-Acrylamid	18,2 ml	0,33%	2% Bis-Acrylamid	0,9 ml	0,09%
4x Trenngelpuffer	28 ml	380 mM	4x Sammelgelpuffer	5 ml	125 mM
Seradest	ad. 110 ml		Seradest	ad. 20 ml	
20% APS	150 µl		20% APS	160 µl	
TEMED	70 µl		TEMED	40 µl	

10% SDS-Trenngel	Vol	Endkonz.
40% Acrylamid	27,3 ml	10%
2% Bis-Acrylamid	14,6 ml	0,265%
4x Trenngelpuffer	28 ml	380 mM
Seradest	ad. 110 ml	
20% APS	150 µl	
TEMED	70 µl	

Tab. 41 Puffer für SDS-PAGE

4x Trenngelpuffer		4x Sammelgelpuffer	
Tris/HCl pH 8,8	1,5 M	Tris/HCl pH 6,8	500 mM
SDS	0,4%	SDS	0,4%

Tab. 42 2x Ladepuffer für Proteine

Komponente	Vol	Endkonz.
98% Mercaptoethanol	2,5 ml	5%
10% SDS	10 ml	2%
87% Glycerol	11,5 ml	20%
4x Sammelgelpuffer	12,5 ml	125 mM
Seradest	ad. 50 ml	

-Spatelspitze Bromphenolblau

Tab. 43 Laufpuffer für SDS-PAGE

1x Laufpuffer	Menge/Vol	Endkonz.
Tris/HCl	3 g	25 mM
Glycin	14,4 g	190 mM
10%SDS	10 ml	0,1%
Seradest	ad 1L	

Tab. 44 allgemeine Daten zur SDS-PAGE

Gele	Gelgröße	mA für Gellauf	Markermenge
Mini	5 cm x 7 cm	20-30 mA	5 µl
Midi	10 cm x 14 cm	25 mA	10 µl
Maxi	10 cm x 28 cm	25 mA	10 µl

### 3.2.3.10. Native (nichtdenaturierende) Gelelektrophorese (Diederich et al. 1994)

In der nativen Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrer Konformation, Ladung und dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die native Elektrophorese wurde verwendet, um die Bildung der Komplexe zwischen SigB, RsbW und RsbV zu untersuchen. Die Acrylamidkonzentration der Gele lag bei 12,5%. Um dicht beieinander liegende Banden zu trennen, wurden 30 cm Sigma-Gele eingesetzt. Zur schonenden Auftrennung der Extrakte wurde die native Elektrophorese ÜN bei 4°C mit 5 mA/Gel durchgeführt. Die angegebene Gellösung ergibt zwei Midigele.

**Tab. 45 Zusammensetzung und Puffer für Nativgele**

Komponente	Vol	Endkonz.	nativer Laufpuffer	
40% Acrylamid	51,15 ml	12,5 %	Tris/HCl Glycin	25 mM
2% Bis-Acrylamid	27,3 ml	0,33%		192 mM
2 M Tris/HCl pH 8,5	16,8 ml	200 mM	<b>nativer Probenpuffer</b>	
87% Glycerol	38,63 ml	20%		
Seradest	ad. 165 ml			
20% APS	150 µl		Glycerol	50%
TEMED	70 µl		-Spatelspitze Bromphenolblau	

### 3.2.3.11. 2D-Proteinelektrophorese

Bei der 2D-Proteinelektrophorese werden die Proteine in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Dazu werden immobilisierte pH-Gradienten (IPG-Streifen) mit einem pH-Bereich, in welchem die interessierenden Proteine liegen, verwendet. Der Streifen wird dann in der zweiten Dimension auf ein SDS-Gel (19 cm x 23 cm) oder ein Minigel (5 cm x 7 cm) aufgelegt. Unter Spannung wandern die Proteine aus dem Streifen ins Gel und werden dort entsprechend der denaturierenden Elektrophorese entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt.

#### 1) Erste Dimension

##### IEF

Die IEF (isoelektrische Fokussierung) wurde mit kommerziellen 7 cm Streifen und 18 cm Streifen (Amersham Pharmacia Biotech) mit einem pH-Gradienten von pH 4-7 durchgeführt.

##### Probenvorbereitung

Die Proben wurden nach der Zellernte und Zellaufschluss in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 8) aufgenommen, da für die erste Dimension die Ionenkonzentration möglichst gering sein sollte.

**Tab. 46 Einhydratisierung von Proteinen in die IPG-Streifen**

	Schritt	18 cm Streifen	7 cm Streifen
1	µg Protein (Rohextrakt) µl/Fraktion aus Gelfiltration gefällt	100 µg	30 µg 250-500 µl
2	Protein in H <sub>2</sub> O lösen	100 µl	100 µl
3	Zugabe von Rehydratlösung	320 µl	135 µl
4	Sofort in die Streifen einhydratisiert		

### Einhydratisierung

Die Proteinproben für die Mini-2D- und 2D-Gele wurden in Rehydratisierungslösung aufgenommen und in die Schlitzte eines zum Einhydratisieren verwendeten Acrylglasbrettchens pipettiert. Die Streifen wurden nach Abziehen der Schutzfolie mit der Gelseite nach unten auf die Lösung in die Schlitzten gelegt. Um einer Verdunstung des Wassers und somit die Kristallisierung des Harnstoffs zu verhindern, wurde die Streifen vollständig mit Mineralöl (Dry Strip Cover Fluid von Amersham Pharmacia Biotech) bedeckt und zusätzlich eine Glasplatte auf das Acrylbrettchen gelegt. Das Einhydratisieren erfolgte für mindestens 24 h, da bei kürzerer Rehydratisierungszeit die größeren Proteine nicht in genügender Menge in die IPGs diffundieren.

**Tab. 47 Rehydratisierungslösung für 8 IPG-Streifen**

Komponente	Menge/Vol.	Endkonz. der 3ml-Stocklösung	Endkonz. für 18 cm Streifen	Endkonz. für 7 cm Streifen
Urea	1,92 g	6,1 M	4,6 M	3,5 M
Thiourea	0,61 g	1,5 M	1,14 M	0,87 M
CHAPS	80 mg	25 mM	19 mM	14,5 mM
Pharmalyte 3-10	52,5 µl	1,33%	1%	0,77%
DTT	17,5 mg	30 mM	22,8 mM	17,4 mM
Seradest	ad. 3 ml		100 µl Proteinlösung +	100 µl Proteinlösung +
Bromphenolblau	Spatelspitze		320 µl Rehydratlösung	135 µl Rehydratlösung

### Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit der Multiphor II-Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech). Durch vorsichtiges Abspritzen wurde der restliche Harnstoff mit Seradest von den Streifen entfernt und die Streifen mit feuchtem Filterpapier kurz abgetrocknet. Dann konnten die Streifen in die Apparatur eingelegt werden (saure Seite zum Pluspol). Zusätzlich zu den beiden Elektrodenstreifen an den Gelenen wurde an der basischen Seite ein mit DTT (500 µl, 15 mM) getränkter Elektrodenstreifen aufgelegt. Beide Streifenenden wurden mit nassem Watmanpapier bedeckt, um eventuell vorhandene Salze aufzunehmen. Die Streifen wurden vor dem Lauf mit Mineralöl bedeckt. Der Lauf erfolgte bei 20°C. Das Stromversorgungsgerät (EPL-35S00-XL) wurde nach den folgenden Schemata (Tab. 48 und 49) programmiert: Dabei wurde wie gekennzeichnet, jeweils ein linearer Gradient von Stufe eins zu zwei und von Stufe drei zu vier angelegt.

**Tab. 48 Multiphorprogramm für 18 cm IPG-Streifen**  
(Sven Hövel 2002)

Stufe	V	mA	W	Vh
1. Gradient	500	1	5	500
2.	500	1	5	2500
3. Gradient	3500	1	5	10000
4.	3500	1	5	35000

**Tab. 49 Multiphorprogramm für 7,5 cm IPG-Streifen  
(Corinna Henkel 2002)**

Stufe	V	mA	W	Vh
1. Gradient	0-500	2	5	500
2.	500	2	5	500
3. Gradient	3500	2	5	5000
4.	3500	2	5	8000

#### Aufbewahrung der Proben

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen, die nicht sofort für die zweite Dimension verwendet wurden, in Acrylglasbrettchen bei -20°C gelagert.

#### 2) Dimension: SDS-PAGE

##### Äquilibration

Die Bedingungen der Äquilibration der IPG-Streifen sind kritisch, um einerseits eine minimale Diffusion der Proteine und andererseits einen möglichst vollständigen Übergang der Proteine von den IPG-Streifen auf die SDS-Gele zu erreichen. Die Streifen wurden für die zweite Dimension 15 min zunächst in Lösung A und dann in Lösung B auf dem Schüttler bei RT äquilibriert.

**Tab. 50 Äquilibrationslösung für IPG-Streifen**

Komponente	Lösung A		Lösung B	
	Menge/Vol	Endkonz.	Menge/Vol	Endkonz.
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	2,5 ml	50 mM	2,5ml	50 mM
Urea	9 g	6 M	9 g	6 M
Glycerol	8,6 ml	30%	8,6 ml	30%
10% SDS	10 ml	4%	10 ml	4%
Seradest	ad. 25 ml		ad. 25 ml	
DTT	87,5 mg	0,023 M		
Jodacetamid			1,125 g	0,21 M
Bromphenolblau			Spatelspitze	

#### SDS-PAGE

Für die Analyse der Modifikation von RsbV in der Gelfiltrationsanalyse wurden in der 1. Dimension 7 cm IPG-Streifen verwendet, welche in der 2. Dimension auf SDS-Minigele aufgelegt wurden. Minigele hatten den Vorteil, dass sie in der 2. Dimension nur 1h Laufzeit benötigen und dann ÜN geblottet werden konnten. Der pH-Shift von RsbV zu phosphoryliertem RsbV (RsbV-P) ist nach dem Blotten in Mini-2D-Gelen sehr gut sichtbar.

Zur Analyse der Anschaltung des SigB-Regulons im Wildtyp, der *rsbV*- und *sigB*-Mutante wurden die „großen“ Gele eingesetzt, um eine maximale Auflösung zu bekommen. Für die „großen“ 2D-Gele wurden immer 6 Gele gemeinsam in der Gelkammer von ESA (Maryland,

USA) gegossen. Für die Mini-2D-Gele stand eine 10er Gießkammer (Biorad) zur Verfügung. Um eine gerade Front für das Auflegen der Streifen zu erhalten, wurde die Trenngellösung mit 1-2 ml Seradest pro Gel überschichtet und 1-1,5 h polymerisieren gelassen, bevor das Sammelgel darauf gegossen und ebenfalls überschichtet wurde. Dabei wurde zwischen Sammelgel und Rand noch Platz für den später einzubettenden Streifen gelassen. Auch das Sammelgel wurde überschichtet, um eine scharfe Laufront zu erreichen. Die Gele wurden in Ständer gestellt und der Abstand zwischen Sammelgel und Rand mit heißer Einbettungsagarose aufgefüllt. Sofort wurden die Streifen in die heiße Agarose auf das Sammelgel aufgelegt. Danach wurden die 2D-Gele vertikal und die Mini-2D-Gele horizontal in die entsprechenden Laufkammern eingesetzt. Die Apparatur und der Laufpuffer waren zuvor auf 10°C gekühlt und der Lauf mit 2,4 W pro Gel bzw. 50 mA pro Minigel gestartet worden. Der Lauf wurde gestoppt, wenn die Bromphenolbande den unteren Gelrand erreicht hatte.

**Tab. 51 Zusammensetzung der 2D-Gele**

12,5% SDS-Trenngel für 6 2D-Gele			Sammelgel für 6 2D-Gele		
Komponente	Vol	Endkonz.	Komponente	Vol	Endkonz.
40% Acrylamid	167,55 ml	12,18%	40% Acrylamid	5,4 ml	3,6%
2% Bis-Acrylamid	89,5 ml	0,32%	2% Bis-Acrylamid	2,7 ml	0,09%
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	137,5 ml	375 mM	4x Sammelgelpuffer	15 ml	125 mM
10% SDS	5,5 ml	0,1%	Seradest	ad. 60 ml	
Seradest	ad. 550 ml		10% APS	220 µl	
10% APS	1,4 ml		TEMED	33 µl	
TEMED	275 µl				

**Tab. 52 Einbettungsagarose zur Fixierung der IPG-Streifen auf den 2D-Gelen**

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
Agarose	1 g	1%
4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8 + 0,4% SDS)	25 ml	125 mM 0,1%
Seradest	ad. 100 ml	

-vor Gebrauch aufkochen

### 3.2.3.12. MALDI-TOF-Analysen

Mit Hilfe der durch massenspektrometrische Untersuchungen erhaltenen Daten konnte (a) bei unverdauten Proteinen die molekulare Masse bestimmt werden und (b) bei verdauten Proteinen mittels einer Datenbanksuche das Protein identifiziert werden. Hier wurde MALDI-TOF (Matrix associated Laserdesorption/Ionisation-Time of Flight) verwendet. Zur Analyse wurde die zu messende Probe auf eine Matrix zusammen mit Eichproteinen aufgespottet. Im ersten Schritt wurde die Probe für den Verdau im Gel vorbereitet. Dazu wurde das mit

Coomassie leicht angefärbte, die Probe enthaltene Gelstück ausgeschnitten, in ein Eppendorfcup überführt und mit 500 µl Trypsin-Digest 1 entfärbt (20 min, 30°C, Schütteln im Thermomixer). Die dabei geschrumpften Gelstückchen wurden im nächsten Schritt wieder auf Originalgröße gebracht. Nach der Inkubation wurde die überschüssige Lösung entfernt, 500 µl Trypsin-Digest 2 aufpipettiert und 30 min, 30°C im Thermomixer geschüttelt. Der Überstand wurde verworfen. Nun wurde das Gelmaterial in der Speedvac getrocknet und dabei auf ca. 20-40% des Ausgangsvolumens geschrumpft, wobei ein vollständiges Austrocknen vermieden wurde. Danach folgte der enzymatische Verdau mit Trypsin. Das Trypsin (Promega; 25 µg) wurde in 200 µl Resuspensionspuffer (Promega) aufgenommen und durch 15 min Schütteln gelöst. Das so gelöste Trypsin wurde in 1,4 ml Trypsin-Digest 3 aufgenommen und 30 µl dieser Lösung auf das Gelmaterial pipettiert. Die Inkubation erfolgte ÜN im Thermomixer unter Schütteln bei 37°C. Die Peptide wurden extrahiert, indem 100 µl Stop- und Elutionslösung zugegeben und ÜN bei 37°C geschüttelt wurde. Der Überstand wurde in ein Eppendorfcup pipettiert und in der Speedvac verdampft, wobei ein Restvolumen von 1-2 µl optimal war. Die hierin enthaltenen Peptide wurden in 10 µl Auftragslösung resuspendiert und für 15 min bei RT geschüttelt. Für die Messung wurde das Eluat mit 0,5 µl  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnaminsäure auf der Platte gemischt und auskristallisieren gelassen.

**Tab. 53** Probenvorbereitung für das MALDI-TOF

	Lösung	Zusammensetzung
1	Trypsin-Digest 1	100 mM Tris/HCl pH 8.5 in 50% Acetonitril
2	Trypsin-Digest 2	100 mM Tris/HCl pH 8.1 in 10% Acetonitril
3	Trypsin-Digest 3	100 mM Tris/HCl pH 8.1, 1 mM CaCl <sub>2</sub> in 10% Acetonitril
4	Enzymlösung (1 Vial/50x)	Trypsin (Promega); 1 µg/5 µl in Rekonstituierungspuffer
5	Stop- und Elutionslösung	75% Acetonitril, 2% TFA
6	Auftragslösung	30% Acetonitril, 1% TFA
7	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnaminsäure	30 µg $\alpha$ -Cyano + 500 µl Acetonitril, 5 min vortexen, + 500 µl Seradest, 5 min vortexen, 1 min 5000 rpm zentrifugieren

### 3.2.3.14. Proteinnachweis durch Gelfärbung

#### 1) Gelfärbung

Die Färbung erfolgte mit Phast Gel-Blue R350-Tabletten (Amersham Pharmacia Biotech). Entsprechend den Herstellerangaben (Amersham Pharmacia Biotech) wurde eine 10fach konzentrierte 0,2%ige Stammlösung hergestellt. Die Lösung wurde filtriert (Filter von Schleicher & Schuell).

**Tab. 54 Lösungen für die Coomassiefärbung und zum Entfärben**

10x Stammlösung		Entfärber	
R350-Stammlösung (0,2%ig)	100 ml	Essigsäure	30%
Methanol	270 ml	Methanol	10%
Essigsäure	90 ml		
Seradest	ad. 1 l		

-Lagerung bei 4°C

## 2) Silberfärbung nach Blum et al. 1987 (modifiziert von Schütz 1998)

Die Silberfärbung, welche sensitiver als Coomassie ist, wurde zur Detektion von 2D-Gelen mit 100 µg Beladung verwendet. Die Nachweisgrenze dieser Gelfärbemethode liegt bei 1-5 ng. Alle Inkubationsschritte erfolgten auf dem Schüttler oder unter gleichmäßigem Schwenken per Hand. Die einzelnen Schritte sind in Tab. 55 aufgeführt. Fixierer, Sensitivierer und Entwickler wurden frisch angesetzt.

**Tab. 55 Schritte der Silberfärbung**

	Schritt	Dauer
1	Fixierung	Mindestens 1h oder ÜN
2	Waschen	3x 20 min
3	Sensitivierung	1 min
4	Waschen	3x 20 sek
5	Silberfärbung	20 min
6	Waschen	3x 20 sek
7	Entwicklung	1-3 min
8	Abstoppen	30 min

-Lagerung in Seradest bis zum Einscannen

**Tab. 56 Fixierer für Silberfärbung**

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
Methanol	500 ml	50%
Essigsäure	120 ml	12%
37% Formaldehyd	0,5 ml	0,05%
Seradest	ad. 1 l	

**Tab. 57 Lösung für Silberfärbung**

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
AgNO <sub>3</sub>	2 g	0,2% (w/v)
37% Formaldehyd	0,75 ml	0,075%
Seradest	ad. 1 l	

**Tab. 58 Entwickler für Silberfärbung**

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	60 g	16,7%
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	4 mg	
37% Formaldehyd	0,5 ml	0,05%
Seradest	ad. 1 l	



**Tab. 59 Stopplösung für Silberfärbung**

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
Glycin	10 g	1%
Seradest	ad. 1 l	

### 3.2.4. Immunologische Methoden

#### 3.2.4.1. Western-Blot und Immundetektion

Die Proteine wurden aus den 12,5%igen Gelen mittels Nasstransfer auf Protean-Nitrocellulose übertragen. Der Nasstransfer wurde in 4 l-Kammern von Sigma (ÜN, 4°C, 100 mA) unter langsamen Rühren des Puffers durchgeführt. Die Blots wurden bis zur Detektion in Seradest aufbewahrt. Für die Detektion wurde die Membran 1 h oder ÜN in 1x Blotto präinkubiert. Dann wurden die Blots mit Blotto, welcher den ersten Antikörper enthielt, in Plastikfolie luftblasenfrei eingeschweißt und für 2-3 h auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Für Mini-Blots (6 x 8 cm) wurde 10 ml 1x Blotto, für Midiblots (10 x 13 cm) wurden 15 ml verwendet. Der erste Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 20 min mit 100 ml 1x Blotto entfernt. Dann wurde der Blot entsprechend mit dem 2. Antikörper für 1,5-2 h inkubiert. Danach wurde der Blot 3x mit 300 ml Seradest für 15 min gewaschen. Vor der Detektion mit Alkalischer Phosphatase wurde der Blot in 100 mM Tris pH 9,5 geschwenkt. Die Detektion erfolgte entweder auf dem Fluoreszenzimager MD Storm 850 (Molecular Dynamics) in der Einstellung „Blue Chemifluorescence“, „100 micron“ mit ECF (Amersham Pharmacia Biotech) als Substrat oder kolorimetrisch durch Umsetzung eines Farbstoffes (Biorad-AP-Kit). Die Auswertung der Chemifluoreszenz erfolgte mit dem Auswertungsprogramm „Image Quant“ im Modus „Local Median“.

#### 3.2.4.2. Western-Blot zur Analyse der Mutanten

Für Western-Blots wurden von der jeweiligen Probe 60 µg Protein pro Spur aufgetragen. Um die Induktionsstärke der Banden untereinander vergleichen zu können, musste gesichert sein, dass sich in jeder Spur die gleiche Proteinmenge befand. Deshalb wurden die Blots zusätzlich mit Anti-RsbS und Anti-RsbU detektiert, weil sich die Menge dieser Proteine während der Stressantwort nicht ändert und diese somit als interne Marker dienen können. Da sowohl RsbV und RsbS als auch SigB und RsbU sehr ähnliche molekulare Massen haben, im Blot also an der selben Stelle detektieren würden, wurden von jeder Probe zwei

Blots angefertigt. Blot 1 wurde mit Anti-SigB und Anti-RsbS geprobt und Blot 2 entsprechend mit Anti-RsbV, Anti-RsbW und Anti-RsbU.

### 3.2.4.3. Quantitativer Western-Blot

Zur Analyse der Menge an SigB, RsbW und RsbV im *B. subtilis*-Rohextrakt wurden die gereinigten Proteine in verschiedenen Mengen (100 ng-0,625 ng) als Eichreihe auf SDS-Gele aufgetragen. Die zu beobachtenden Laufunterschiede zwischen Eichprotein und Rohextraktprotein liegen in der etwas höheren molekularen Masse der *strep*getaggen Eichproteine begründet: Je geringer die Masse des Protein ist, umso stärker war der Laufunterschied im Gel zu beobachten: Daher war der Unterschied bei RsbV am größten und bei SigB am kleinsten.

Um den Verlust der gereinigten Proteine durch Adsorption an die Eppendorfcups während des Pipettierens zu vermeiden, wurden mit Silan beschichtete PCR-Cups und Spitzen verwendet. Bei den am Ende der Promotion durchgeführten Blots wurde der SDS-Probenpuffer mit 0,5 mg/ml (EK) BSA versetzt, welches als Trägermolekül für die gereinigten Proteine diente. Pro Spur wurden 60 µg Rohextrakt aufgetragen. Es wurden 48°C Hitze, 3% NaCl, 4% Ethanol untersucht. Dafür wurde der Wildtyp PY22 gewählt, da zuvor ausgeführten Analysen zu diesen Stressarten mit diesem Stamm angefertigt wurden. Es wurden Mini- und Midigele verwendet.

Nach dem Lauf wurden die Gele geblottet und mit monoklonalen Antikörpern detektiert.

**Tab. 60 monoklonale Antikörper**

Antikörper	Bezeichnung	Eingesetzte Verdünnung
Anti-SigB	H106-14B5 (3G6)	(1:100)
Anti-RsbS	H129-2T12 (2B2)	(1:500)
Anti-RsbU	H126-1C10 (4C10)	(1:200)
Anti-RsbV	H110-13C6 (3D4)	(1:25)
Anti-RsbW	H110-3A7 (3C8)	(1:25)

**Tab. 61 Laufpuffer (Nasstransfer) für Western-Blot**

Komponente	Endkonz.
Tris/HCl pH 8,0	20 mM
Glycin	150 mM
Methanol	20%

Minigele wurden in 10 ml und Midigele in 15-20 ml 1x Blotto inkubiert. Als 2. Antikörper wurde ein Ziege-Anti-Maus IgG (H + L-Kette) von Biorad in der Verdünnung (1:2500) verwendet.

**Tab. 62 10x Blottostammlösung**

Komponente	Menge
Tris/HCl	60,5 g
NaCl	87,7 g
pH 7,6 einstellen	
Seradest	ad. 1 l

**Tab. 63 Inkubationslösung für Western-Blot-Membranen: 1x Blotto**

Komponente	Menge
Magermilchpulver "Glücksklee"	12,5 g
10 x Blotto	50 ml
Seradest	450 ml

-Spatelspitze  $\text{NaN}_3$   
 -0,5 h Rühren lassen

## 4 Ergebnisse

Die hier vorgelegten Ergebnisse lassen sich in einen ersten biochemischen und einen zweiten eher physiologisch ausgerichteten Teil gliedern. Der erste Komplex umfasst die Proteinreinigungen und die mit den gereinigten Proteinen durchgeführten Studien. Im physiologischen Teil werden neue Erkenntnisse zur Rolle der generellen Stressantwort bei *B. subtilis* in der Kälte aufgezeigt.

### 4.1. Analyse der Protein-Interaktionen von SigB, RsbW und RsbV

#### 4.1.1. Proteinexpression und Reinigung

##### 4.1.1.1. Klonierung der Gene *rsbV*, *rsbW*, *sigB* mit dem *Strep*-tag Expressionsvektor pASK-IBA3

Um Interaktionsstudien zwischen SigB und seinen primären Regulatoren RsbW und RsbV durchführen zu können, wurden die einzelnen Proteine mit hohem Reinheitsgrad und in größerer Menge benötigt.

Zur Überexpression der Proteine SigB, RsbW und RsbV wurde der Vektor pASK-IBA3 verwendet, welcher die Fusion mit einem C-terminalen, nicht abspaltbaren *Strep*-tag erlaubt. Die Wahl eines C-terminalen Tags hatte gegenüber einem N-terminalen Tag den Vorteil, dass nur vollständig exprimierte Proteine an die StrepTactin-Säule binden konnten. Die Gene *sigB*, *rsbW* und *rsbV* wurden, bis auf das Stopcodon, mit der *Pfu*-Proof-Reading Polymerase und dem Plasmid pML7 als Template mittels PCR amplifiziert. Die in der PCR

verwendeten Primer enthielten bereits Schnittstellen für *Bsal*, mit welchem Plasmid und PCR-Produkt geschnitten wurden. Das nach der Klonierung und Ligation erhaltene Plasmid wurde durch einen Kontrollverdau mit *Xba*I und *Hind*III überprüft. Durch Sequenzierung wurde sichergestellt, dass die Sequenz der Fusion korrekt und der *Strep*-tag erfolgreich angehängt worden war.

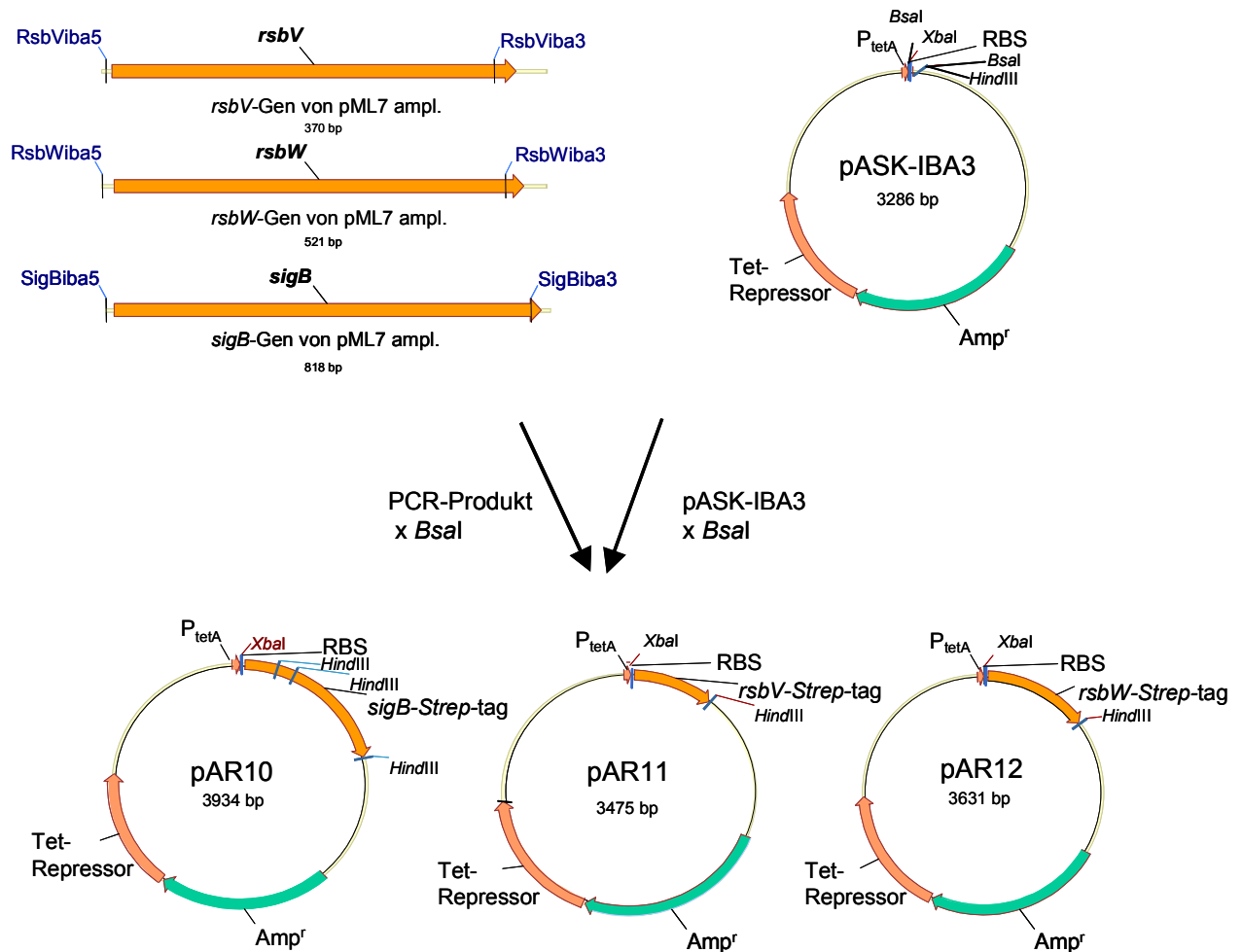
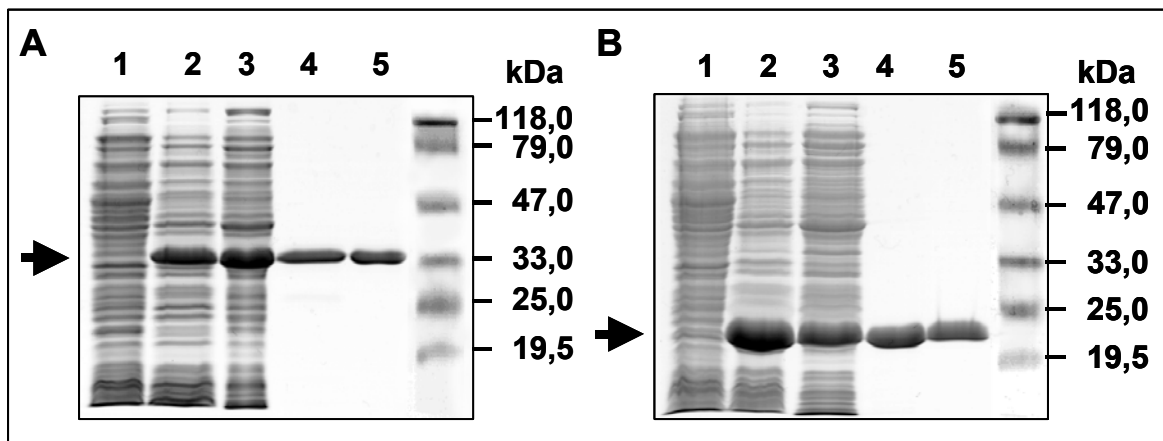


Abb. 5 Klonierungsstrategie der Gene *sigB*, *rsbW* und *rsbV* in *pASK-IBA3*

#### 4.1.1.2. Reinigung der Proteine SigB, RsbW und RsbV

SigB, RsbW und RsbV wurden heterolog in *E. coli* exprimiert. Für die Expression wurde ein Stamm (ER2655) verwendet, welcher eine verminderte Zahl an Proteasen enthielt, da insbesondere SigB und RsbW in den herkömmlichen Stämmen stark abgebaut wurden. Der Anteil des löslichen, heterolog exprimierten Proteins konnte durch ein Absenken der Temperatur von 37°C auf 30°C wesentlich erhöht werden. Die einzelnen zur Reinigung der drei Proteine benötigten Schritte sind in Abb. 6 A/B und 7 dokumentiert. Bei allen drei Proteinen konnten gute Ausbeuten erreicht werden, wobei für RsbW die stärkste

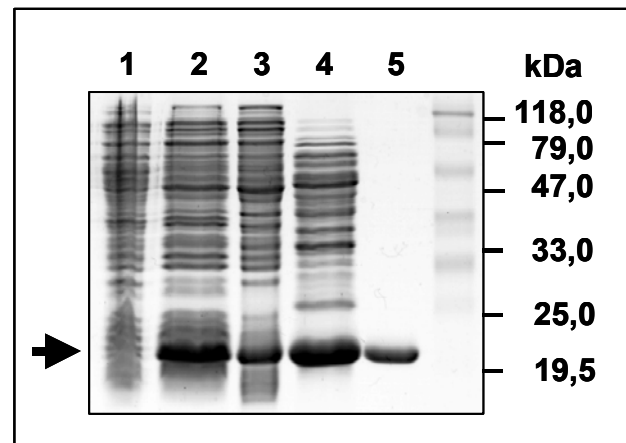
Überexpression erreicht wurde. SigB und RsbW konnten von dem als erste Säule verwendeten StrepTactin-Material zu ca. 90% sauber eluiert werden. Dabei wurde Abbau fast völlig vermieden, indem der Rohextrakt durch zügiges Waschen von den Fusionsproteinen abgetrennt wurde. Zur Entfernung von hochmolekularen Verunreinigungen und geringfügig vorkommenden Fragmenten wurden sowohl SigB als auch RsbW über einen starken Anionentauscher (Resource Q-Säule) mit einem linearen Gradienten 50-500 mM NaCl über 120 ml gereinigt. SigB eluierte bei 250-300 mM NaCl und RsbW bei 350-400 mM NaCl in jeweils 10 ml.



**Abb. 6 Überexpression und Reinigung von SigB und RsbW**

Die mit einem C-terminalen *Strep*-tag fusionierten Proteine SigB und RsbW wurden, durch Induktion mit AHT bei  $OD_{540}=0,5$ , im *E. coli*-Stamm ER2655 in LB für 2,5-3 h exprimiert. Die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellpellets wurden durch Ultraschall aufgeschlossen. Zelltrümmer konnten durch Ultrazentrifugation pelletiert werden. Die sich im Überstand befindenden, löslichen Fusionsproteine wurden über eine StrepTactin-Säule und eine Resource Q-Säule gereinigt. Fraktionen der einzelnen Schritte konnten in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt werden (Spuren 1-5). Zur Größenbestimmung wurde ein vorgefärbter Marker aufgetragen. Die Größen der Standardproteine sind in kDa angegeben. **A)** SigB-*Strep*-tag, **B)** RsbW-*Strep*-tag. Aufgetragen sind Aliquots aus den jeweils gepoolten Fraktionen: (1) *E. coli*-Rohextrakt ohne Induktion mit AHT (2) Rohextrakt einer mit AHT induzierten Kultur (3) Überstand nach Ultrazentrifugation (4) Eluat der StrepTactin-Säule (5) Eluat der Resource Q-Säule.

Für die effiziente Reinigung von RsbV wurde der Affinitätssäule eine Q-Sepharose-Säule vorgeschaltet (Abb. 7), da RsbV schwächer exprimiert wurde als SigB und RsbW und diese Säule im Vergleich zur empfindlicheren Affinitätssäule den Einsatz einer höheren Menge Rohextrakt erlaubte. RsbV eluierte in einem 250ml-Gradienten über 50-700 mM NaCl bei 150-200 mM NaCl in ca. 9 ml. Das so angereinigte RsbV eluierte sauber von der StrepTactin-Säule.



**Abb. 7 Überexpression und Reinigung von RsbV**

RsbV-*Strep*-tag wurde in ER2655 exprimiert. Bei  $OD_{540}=0,5$  wurde die Expression durch Zugabe von AHT für 3 h induziert. Die Zellen wurden mit einem Ultraschallstab aufgeschlossen. Feste Zellbestandteile wurden durch Ultrazentrifugation vom Überstand abgetrennt. RsbV lag in löslicher Form im Rohextrakt vor und wurde mittels einer Q-Sepharose und einer Affinitätschromatographie mit (StrepTactin-Material) gereinigt. Die molekularen Massen sind mit Hilfe des vorgefärbten Markers markiert. Aliquots der einzelnen Schritte wurden im 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. Aufgetragen sind Aliquots aus den jeweils gepoolten Fraktionen: (1) *E. coli*-Rohextrakt ohne Induktion mit AHT (2) Rohextrakt einer mit AHT induzierten Kultur (3) Überstand nach Ultrazentrifugation (4) nach der Q-Sepharose-Säule (5) nach der StrepTactin-Säule.

Die gereinigten, in Lösung vorliegenden Proteine SigB, RsbW und RsbV wurden zur Identifizierung und Massenbestimmung im MALDI-TOF unverdaut gemessen. Die im MALDI-TOF erhaltenen Massen stimmten mit den berechneten Massen sehr genau überein (Tab. 64), was zeigte, dass die Proteine nach der Reinigung vollständig vorlagen und nicht partiell abgebaut worden waren.

**Tab. 64 molekulare Massen der gereinigten Proteine**

molekulare Masse	SigB (kDa)	RsbW (kDa)	RsbV (kDa)
<i>B. subtilis</i>	29994,6	17849,6	17998,0
<i>E. coli</i> (theoretisch)	30969,5	19192,4	13138,1
<i>E. coli</i> (MALDI-TOF-Bestimmung)	30968,2	19192,8	13142,9

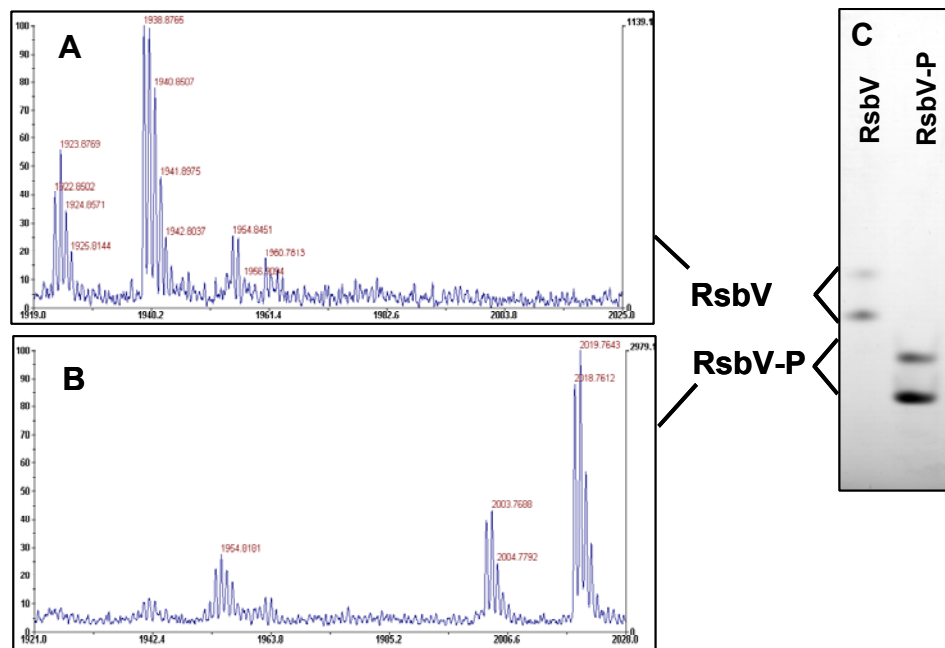
#### 4.1.1.3. „In vitro“-Herstellung von gereinigtem RsbV-P

Für einige Ansätze der Bindungsstudien in der nativen Gelelektrophorese sollte schon fertig phosphoryliertes RsbV eingesetzt werden. Daher musste RsbV „in vitro“ phosphoryliert werden. RsbW hat neben seiner Funktion als Antisigmafaktor für SigB zu agieren, auch eine Kinasefunktion, welche spezifisch für RsbV ist (Alper et al. 1996). Im Unterschied zu dem regulatorisch ähnlich wirkenden Protein SpoIIAB, bildet RsbW keine längerfristigen Intermediate unter Bindung von Nukleotiden (Alper et al. 1996). RsbW bindet ATP wahrscheinlich nur kurz, wobei ATP unter Abspaltung der Phosphatgruppe zu ADP umgesetzt wird. Von Alper et al. (1996) wurde auch bestimmt, dass RsbW mit mehreren 100 µmol verhältnismäßig hohe ATP-Level für die Phosphorylierung von RsbV braucht.

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde für die Phosphorylierungsreaktion und in den folgenden Bindungsstudien ein Überschuss an ATP (1mM EK) eingesetzt. Gereinigtes RsbW und RsbV wurden im Verhältnis 1:2 zusammen mit ATP für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Das unterschiedliche Elutionsverhalten der beiden Proteine von einer Q-Sepharose-Säule ermöglichte die vollständige Trennung von RsbV-P und RsbW (Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig wurde auf diese Weise ATP entfernt. Durch ein SDS-PAGE wurde geprüft, dass RsbV-P sauber vorlag und ein zu einer RsbV-Bande identisches Laufverhalten aufwies (Daten nicht gezeigt). Die Phosphorylierung konnte in einem nativen Tris-Glycin-Gel (pH 8,5) sehr gut nachgewiesen werden, da es wegen der zusätzlichen negativen Ladung eine erhöhte elektrophoretische Mobilität im Vergleich zu RsbV ohne Phosphat aufwies. Wie Abb.8 zeigt, hatte RsbV die Eigenschaft im Nativgel in zwei Banden zu laufen. Beide Banden wurden durch die zusätzliche Phosphatgruppe zum Gelende hin verschoben. Das phosphorylierte RsbV wies im Coomassie-Brilliantblaugel eine komplette Verschiebung auf, so das hiermit gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung vollständig war und außerdem so stabil, dass während der Gelelektrophorese kein nennenswerter Zerfall erfolgte.

Zum Nachweis, dass es sich bei beiden Banden um RsbV bzw. RsbV-P handelte, wurden die Banden von RsbV aus dem Gel ausgeschnitten und nach einem tryptischen Verdau im MALDI-TOF vermessen. Sowohl bei RsbV als auch bei RsbV-P zeigten beide Banden im MALDI-TOF einen fast identischen „pmf“ (peptide mass fingerprint). In den Spektren von RsbV und RsbV-P waren geringfügige Unterschiede im Bereich um 1920-2020 Da zu sehen. Der Massenunterschied betrug ca. 80 Da, was die Phosphorylierung von RsbV-P anzeigt und bestätigt. Aus diesen Spektren wurde geschlossen, dass es sich bei den jeweiligen

beiden Banden nur um verschiedene RsbV-Formen handelt, welche auf nicht einheitliche Konformationen oder eine Methioninmethylierung zurückzuführen sind.



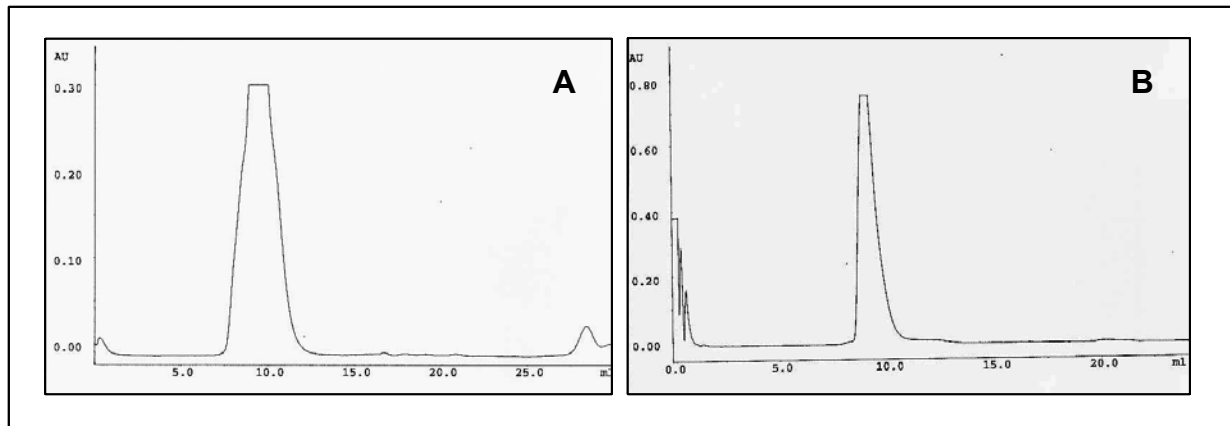
**Abb. 8 Nativgel und MALDI-TOF-Analyse der gereinigten Fusionsproteine RsbV und RsbV-P**

Die RsbV-Banden wurden als kleine Gelstücke ausgeschnitten und einem Trypsinverdau unterzogen. Hier sind die in der MALDI-TOF-Untersuchung erhaltenen Spektren gezeigt. **A)** RsbV-Bande **B)** RsbV-P-Bande **C)** Nativgelausschnitt: RsbV und RsbV-P

#### 4.1.2. Analyse des Oligomerisierungsgrades der gereinigten Proteine SigB und RsbW

Unter Nutzung einer analytischen Gelfiltrationssäule Superdex 75 konnte der Oligomerisierungsgrad der gereinigten, mit einem *Strep*-tag versehenen Proteine bestimmt werden. Wie Abb. 9 zeigt, eluierten RsbW, welches als Monomer eine molekulare Masse von etwa 19 kDa aufweist und SigB (31 kDa) nach den gleichen Volumina. Entsprechend bekannter Elutionsvolumina der experimentell geeichten Säule und einem Vergleich der RsbW- (Abb. 9 A) und SigB-Chromatogramme (Abb. 9 B) konnte geschlossen werden, dass SigB als Monomer und RsbW als Dimer vorliegt.





**Abb. 9 Analytische Gelfiltration von SigB und RsbW**

Die gereinigten Proteine wurden zur Überprüfung des Oligomerisierungsgrades über eine analytische Gelfiltrationssäule gegeben und das Chromatogram aufgezeichnet. **A)** RsbW **B)** SigB

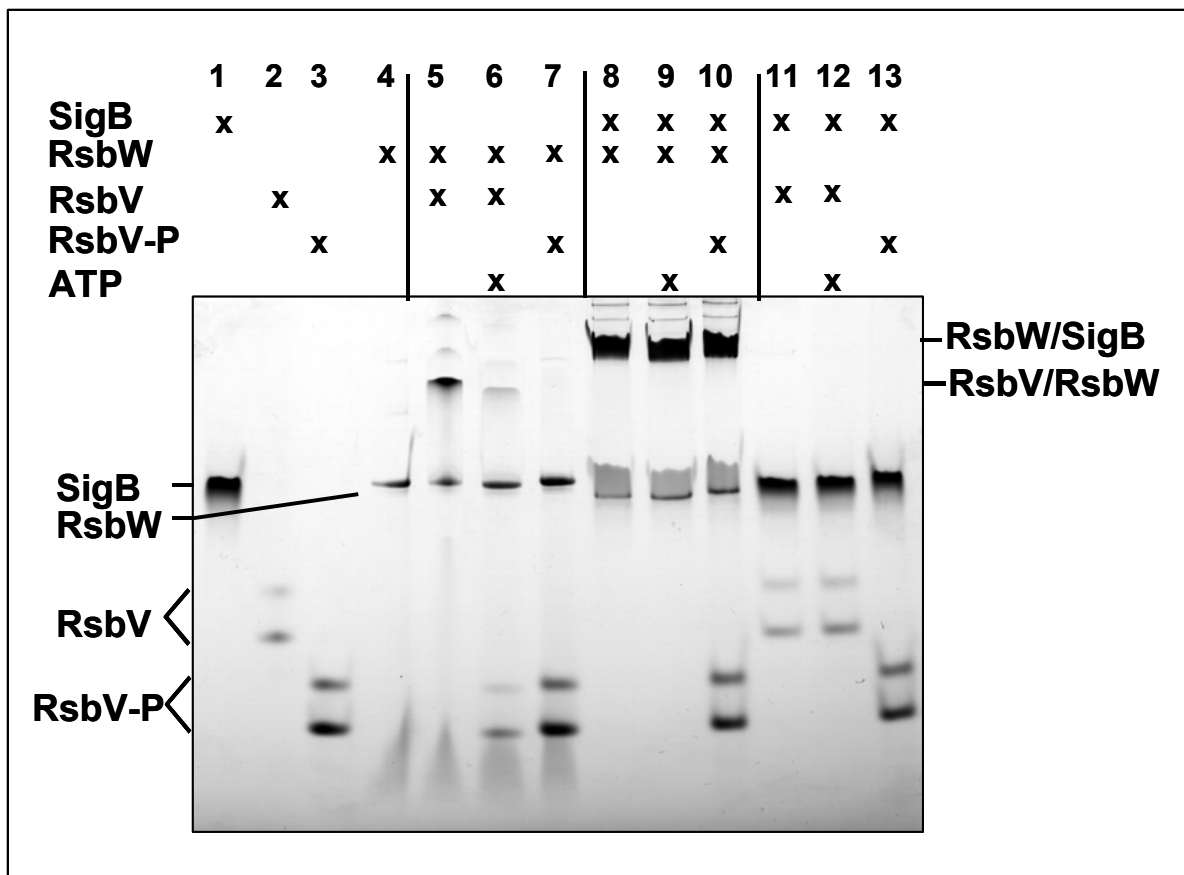
#### 4.1.3. Bindungsstudien von SigB, RsbW und RsbV im Nativgel

Untersuchungen zu den Interaktionen der an der SigB-Regulation beteiligten Proteine, insbesondere von SigB, RsbW und RsbV, wurden erstmals in Gelfiltrationsstudien durch Fraktionierung von *B. subtilis*-Rohextrakten 1994 von Dufour und Haldenwang durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit sollten detailliertere Informationen über die Komplexe mit Hilfe der heterolog exprimierten und gereinigten Proteine SigB, RsbW, RsbV und RsbV-P gewonnen werden.

Dazu wurde die native Gelelektrophorese in diesem Labor etabliert. Das Prinzip der Auftrennung im Nativgel beruht dabei auf Ladung, Molekulargewicht und Konformation der zu trennenden Proteine, wobei stabile Komplexe während der Elektrophorese erhalten blieben. Da für die Aktivitätskontrolle der gereinigten Proteine außerdem kein Assay existierte, konnte die native Elektrophorese auch gleichzeitig zum Nachweis der Funktionsfähigkeit der mit einem *Strep*-tag fusionierten Proteine eingesetzt werden. Die native Elektrophorese wurde für das homologe SigF-System schon erfolgreich zur Analyse von SpoIIAA<sup>-</sup>-Mutanten (Barilla 1999) und zur Untersuchung von Komplexbildung/bzw. Interaktionsstudien von SpoIIAA und SpoIIAB eingesetzt (Diederich et al. 1994, Lee 2000). Die Auswertung erfolgte durch Anfärben mit Coomassie-Brilliantblau.

Die einzelnen, in separaten Spuren aufgetragenen Proteine SigB, RsbV, RsbV-P und RsbW (Abb. 10, Spur 1-4) erlaubten als interne Marker die Unterscheidung der Komplexe von den ungebundenen Proteinen. Im Vergleich zu den einzeln vorliegenden Proteinen, wiesen die

RsbW/SigB- und RsbV/RsbW-Komplexe eine deutlich geringere elektrophoretische Mobilität auf.



**Abb. 10 Analyse der Komplexbildung im Nativgel**

0,5 nmol der gereinigten Proteine wurden entweder direkt in nativem Probenpuffer aufgenommen und auf ein 12,5%iges Tris-Glycin-Nativgel aufgetragen oder gemischt, und für die Komplexbildung 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 4°C, 5 mA/Gel. Die Gele wurden mit Coomassie-Brilliantblau angefärbt. Die Beladung der einzelnen Spuren ist in der Beschriftung gekennzeichnet.

Die hier durchgeführten Interaktionsstudien zeigten, dass die elektrophoretische Mobilität bei den hier eingesetzten Proteinen mit dem Molekulargewicht korrelierte. Kleine Proteine wanderten generell weiter in das Gel ein, als größere Proteine. Wie in Abb. 8 c dargestellt, zeigt Spur 2, dass RsbV in zwei etwa gleichstark angefärbten Banden im Nativgel läuft. Die höhere elektrophoretische Mobilität von RsbV-P bewirkte, dass RsbV und RsbV-P deutlich voneinander getrennt werden konnten. RsbW (Spur 4), welches wie in der Gelfiltration gezeigt, als Dimer gereinigt wurde, läuft im Nativgel sehr wahrscheinlich ebenfalls als Dimer, da sich die RsbW-Bande auf gleicher Höhe mit SigB befindet, welches als Monomer ein doppelt so hohes Molekulargewicht besitzt (Tab. 64). Die RsbW-Bande hatte die Eigenschaft, in der nativen Gelelektrophorese als relativ scharfe Bande zu laufen. Davon kann die SigB-Bande mit einer etwas breiteren, ovalen Form gut unterschieden werden. Im

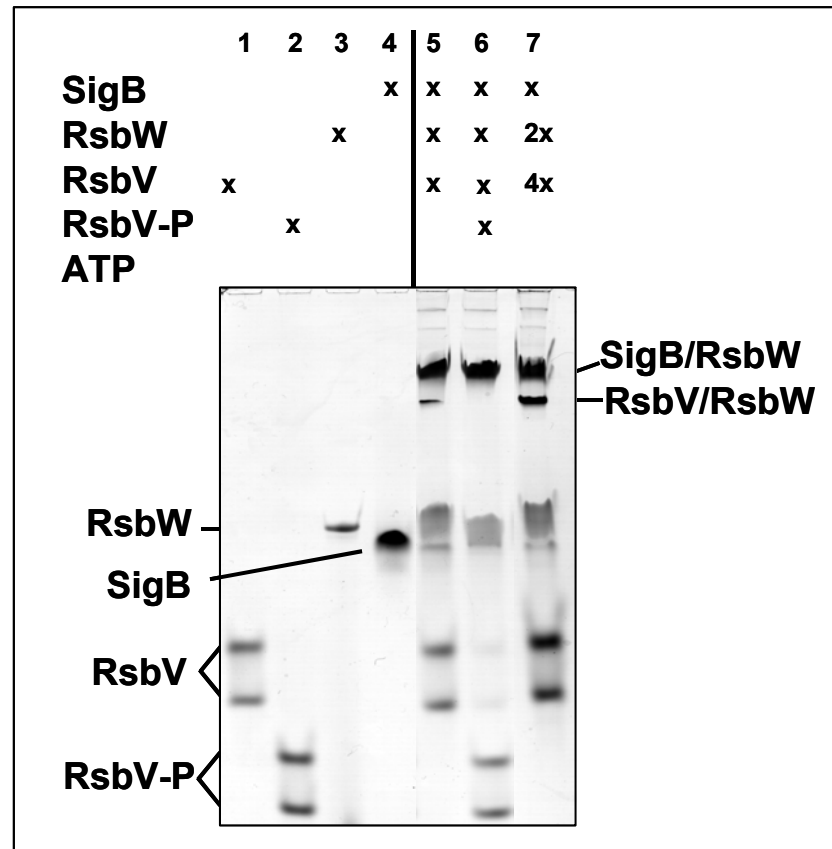
Gegensatz zu RsbV trennten SigB und RsbW in nicht komplexierter Form jeweils nur in einer Bande auf.

In Spur 5 wurden äquimolare Mengen an RsbV und RsbW gemischt. Als Folge war eine vollständige Verschiebung von RsbV und eine partielle Verschiebung von RsbW in einen Komplex zu beobachten. Wie erwartet, war der Anti-Antisigmafaktor RsbV in der Lage den Antisigmafaktor RsbW zu binden. An der Interaktion waren beide RsbV-Banden beteiligt, was zeigte, dass beide Formen aktiv und damit physiologisch relevant waren. Wurde der gleiche Ansatz in Anwesenheit von im Überschuss vorliegendem ATP durchgeführt (Spur 6), so wurde RsbW in seiner Kinasefunktion aktiv. Entsprechend hatte die Phosphorylierung von RsbV Priorität vor der Bildung des RsbV/RsbW-Komplexes. Das Mischen von RsbW mit RsbV-P (Spur 7), welches schon vorher „in vitro“ phosphoryliert worden war, verhinderte wie erwartet eine Komplexbildung vollständig.

In Spur 8-10 wurde die Komplexbildung zwischen dem Sigmafaktor SigB und dem Antisigmafaktor RsbW untersucht. Wie erwartet, konnte ein Komplex gebildet werden, wenn ein Mischungsverhältnis von 1:1 vorlag. Für das SigF-System gilt als nachgewiesen, dass sowohl ATP als auch ADP Einfluss auf die Komplexbildung zwischen SigF, SpoIIAA und SpoIIAB haben (Najafi et al. 1997). Entsprechend wurden hier beide Nukleotide in Bezug auf die Komplexbildung von RsbW/SigB und RsbV/RsbW getestet. Weder ATP noch ADP (ADP hier nicht gezeigt) hatten auf den RsbW/SigB-Komplex einen Einfluss (Spur 9). In Spur 10 wurden SigB, RsbW und schon vorher phosphoryliertes RsbV-P zusammengegeben. Entsprechend dem in der Einleitung beschriebenen Regulationsmodell wurde RsbV-P durch Phosphorylierung völlig inaktiviert (Spur 10) und war nicht mehr in der Lage RsbW zu binden. Der RsbW/SigB-Komplex blieb unverändert bestehen. Schließlich konnte bei gemeinsamer Inkubation von SigB mit RsbV oder RsbV-P mit/bzw. ohne ATP keine Interaktion festgestellt werden (Spur 11-13). Das bestätigte einerseits das bekannte Modell, andererseits zeigte es, dass die gebildeten und im Nativgel aufgetrennten Komplexe spezifisch waren.

In Abb. 11 sind die Komplexe gezeigt, welche sich nach gemeinsamer Inkubation gleicher Mengen (Spur 5 und 6) aller drei Proteine ergeben. In diesem Ansatz bildete ein Teil von RsbW mit SigB und der andere Teil von RsbW mit RsbV einen Komplex (Spur 5). Wurde derselbe Ansatz in Anwesenheit von ATP durchgeführt (Spur 6), fehlte die RsbV/RsbW-Komplexbande, weil RsbV vollständig zu RsbV-P phosphoryliert wurde. Der RsbW/SigB-Komplex wurde durch ATP wie erwartet nicht beeinflusst und blieb unverändert bestehen.

Auch bei einer Mischung von 1SigB:2RsbW:4RsbV (Spur 7) konnte zwar die Menge an RsbV/RsbW-Komplex erhöht werden, aber trotzdem wurde SigB durch einen Teil von RsbW gebunden, so dass überschüssiges RsbV ungebunden vorlag. Ein Überschuss an RsbV verhinderte also nicht die Bildung eines RsbW/SigB –Komplexes.



**Abb. 11 Analyse der Komplexbildung im Nativgel**

Die gereinigten Proteine wurden entweder direkt in nativem Probenpuffer aufgenommen und auf ein 12,5%iges Tris-Glycin-Nativgel aufgetragen oder gemischt, zur Komplexbildung 10 min bei 37°C in GF-Puffer inkubiert und dann auf das Gel aufgetragen. Bei den Komplexen entsprechen 0,5nmol=x. Abweichende Mengen (2x, 4x) sind gekennzeichnet. Der Lauf erfolgte bei 4°C, 5 mA/Gel. Die Gele wurden mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt.

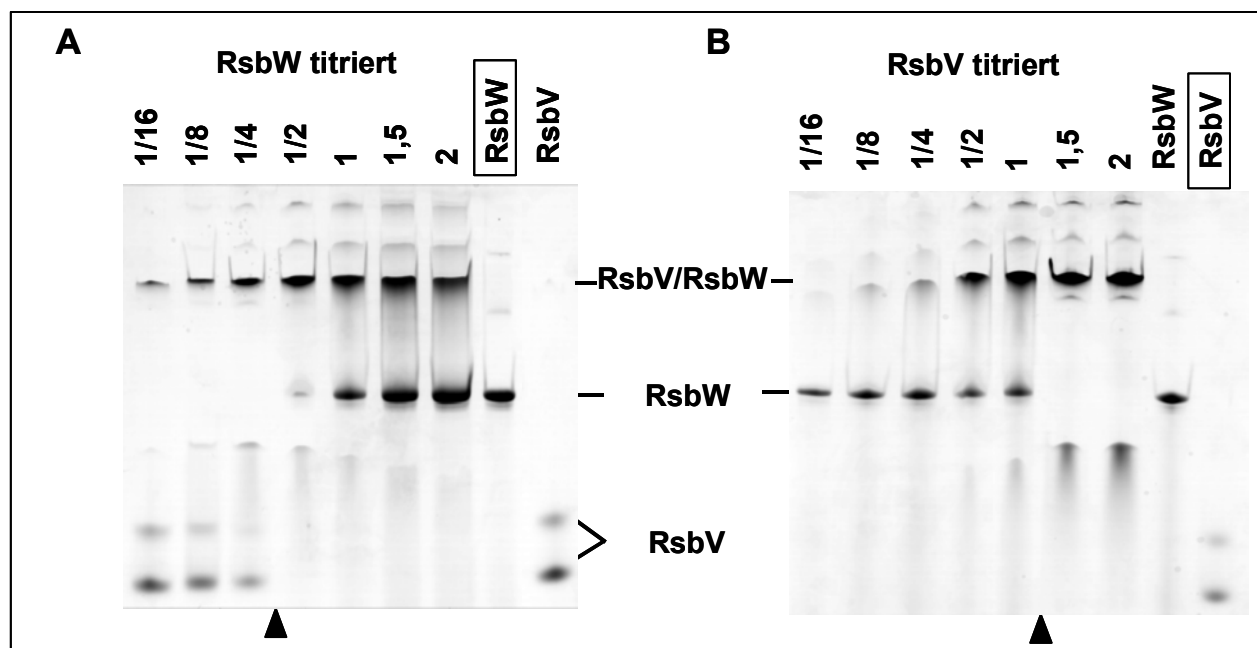
#### 4.1.4. Analyse der Stöchiometrie der Komplexe RsbV/RsbW und RsbW/SigB

Die Untersuchungen wurden, entsprechend den bereits dargestellten Bindungsstudien, in Nativgelen durchgeführt. Dazu wurden die gereinigten Proteine gemischt, wobei ein Reaktionspartner in allen Ansätzen in jeweils gleicher Menge vorlag (0,5 nmol entsprechen 1) und der andere in unterschiedlichen Mengen dazu gegeben wurde. Im Gel ergab sich auf

diese Weise eine semiquantitative Titrationsreihe. Über den einzelnen Spuren ist angegeben, in welcher Menge der titrierte Reaktionspartner eingesetzt wurde.

#### 4.1.4.1. Analyse der Stöchiometrie des RsbV/RsbW-Komplexes

Von Interesse für das Verständnis der Aktivierung von SigB ist die Stöchiometrie des RsbV/RsbW-Komplexes, da SigB nach Stress nur aktiv werden kann, wenn ein Teil von RsbW durch den Anti-Antisigmafaktor weggefangen wird. Untersuchungen der SigF-regulierenden Proteine SpoIIAA und SpoIIAB führten in diesem SigB-ähnlichen System zu der Annahme, dass es sich bei SpoIIAA/SpoIIAB um einen 1:1 Komplex handelt, wobei hier im Unterschied zur SigB-Regulation die Bildung langlebiger Intermediate unter Einbindung der Nukleotide ATP bzw. ADP von besonderer Bedeutung ist (Alper et al. 1994, Duncan et al. 1996, Garsin et al. 1998). In Vorexperimenten zu den hier dargestellten Versuchen konnte entsprechend dem bisherigen Modell der SigB-Regulation kein Einfluss von ADP auf das Bindungsverhalten von RsbV/RsbW gefunden werden (Alper et al. 1996).



**Abb. 12 Analyse der Stöchiometrie des RsbV/RsbW-Komplexes**

Die Menge des konstant gehaltenen Partners betrug 0,5 nmol. In der Legende entsprechen 0,5 nmol=1. Das in der Menge variierte Protein ist mit einem Rechteck gekennzeichnet. Die gereinigten Proteine wurden gemeinsam in GF-Puffer 10 min bei 37°C inkubiert. Der Mix wurde in 2x nativen Probenpuffer aufgenommen und im 12,5%igen Nativgel aufgetrennt. **A)** RsbV konstant, RsbW titriert **B)** RsbW konstant, RsbV titriert.

Die Analyse der Stöchiometrie des RsbV/RsbW-Komplexes wurde wie in den vorhergehenden Studien im Nativgel durchgeführt (Abb. 12). Dazu wurden die gereinigten

Proteine gemischt, wobei jeweils ein Reaktionspartner in allen Reaktionsansätzen in konstanter Menge vorlag (0,5 nmol=1fach) und der andere in unterschiedlichen Mengen dazu gegeben wurde, so dass sich im Gel eine Titrationsreihe ergab (ein Ansatz pro Spur).

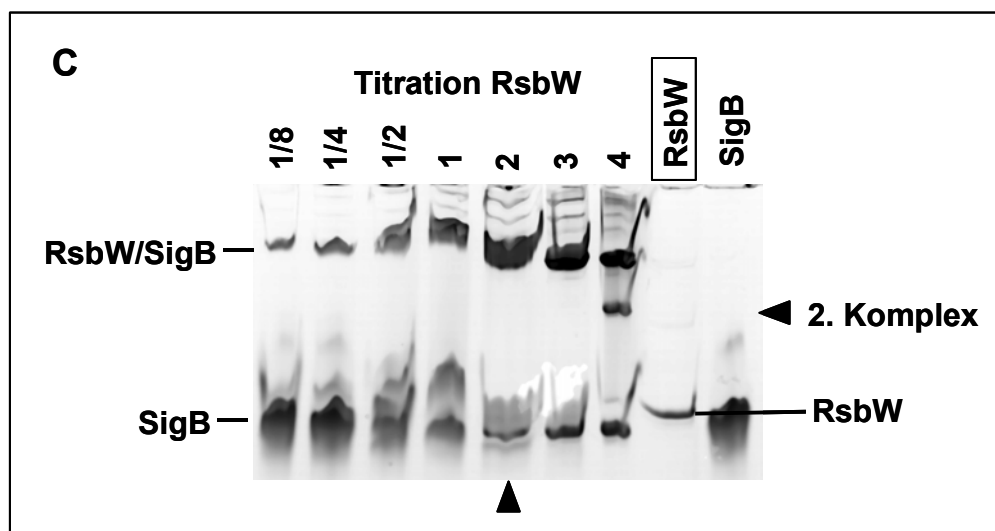
Für die Versuche wurde entsprechend dem bisherigen Modell von einem 1RsbW:2RsbV-Verhältnis ausgegangen. In Abb. 12 A wurde die 1/16-, 1/8-, 1/4-, 1/2-, 1-, 1.5- und 2-fache RsbW-Menge zu RsbV titriert. Es ist deutlich sichtbar, dass die Menge an freiem RsbV mit zunehmender Menge an RsbW abnimmt und die Menge an RsbV/RsbW-Komplex entsprechend steigt. Bei einem 0,5RsbW:1RsbV-Verhältnis wurde alles RsbV im Komplex gebunden und nur eine sehr kleine Menge an RsbW lag bereits wieder ungebunden vor. Wurde die Menge an RsbW weiter erhöht, lag der überschüssige Anteil an RsbW ungebunden vor. Der umgekehrte Ansatz (Abb. 12 B) zeigte, dass eine Menge von 1,5RsbV genügte, um RsbW vollständig zu binden. In diesem Experiment wurden etwas weniger als zwei RsbV zum Komplexieren von einem RsbW benötigt. Da aber gezeigt werden konnte, dass bei einem Überschuss an RsbW maximal ein 1RsbW/2RsbV-Verhältnis möglich war und auch bei einem Überschuss an RsbV die vollständige Bindung an RsbW in etwa bei diesem Verhältnis erfolgte, lassen diese Ergebnisse auf einen  $\text{RsbW}_1:\text{RsbV}_2$ -Verhältnis schließen. Außerdem konnte festgestellt werden, dass sobald beide Reaktionspartner vorhanden waren, der in kleinerer Menge vorliegende Partner vollständig im Komplex gefangen wurde.

#### 4.1.4.2. Analyse der Stöchiometrie des RsbW/SigB-Komplexes

Um Einblicke in die Regulation von SigB zu gewinnen, war es ebenso bedeutend zu wissen, in welchem Verhältnis SigB und RsbW im gebildeten Komplex vorliegen. Die Analyse der zu SigB und RsbW ähnlichen Proteine SigF und SpoIIAB in einem „in vivo“ gebildeten Komplex hatte gezeigt, dass es sich dabei um einen  $\text{SigF}_1\text{SpoIIAB}_2$ -Komplex handelt. Die Analysen wurden von Campell und Darst (2000) mit biochemischen Methoden wie z.B. der „dynamic light scattering“ Methode und analytischer Ultrazentrifugation durchgeführt.

Zur Analyse der Konformation des RsbW/SigB-Komplexes wurden Titrationsexperimente im Nativgel analog zu den RsbV/RsbW-Studien durchgeführt. Es wurde ein Verhältnis ähnlich wie bei SigF/SpoIIAB erwartet. Wie in Abb. 13 zu sehen, war eine Unterscheidung der frei vorliegenden Proteine RsbW und SigB aufgrund ihres ähnlichen Laufverhaltens im Nativgel erheblich erschwert. Daher ist hier auch nur die Titration von SigB gezeigt. RsbW wurde im Verhältnis 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2, 3, 4 mit SigB gemischt. Trotz des schwierigen Laufverhaltens war deutlich an dem Verschwinden der unscharfen, ovalen SigB-Bande zu sehen, dass der

größte Anteil beider Proteine im Komplex vorlag, wenn ein Verhältnis von 0,5 nmol SigB :1 nmol RsbW (1SigB:2RsbW) zusammen inkubiert wurde. Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie, dass es sich um eine SigB<sub>1</sub>RsbW<sub>2</sub>-Konformation handelt (Dufour & Haldenwang 1994). Wurde RsbW in vierfachem Überschuss zu SigB gegeben, war ein zweiter Komplex (Markierung in Abb. 13) zu sehen. Aufgrund seiner intermediären elektrophoretischen Mobilität zwischen den einzelnen Proteinen und dem zuerst gebildeten Komplex, ist anzunehmen, dass es sich bei diesem um einen 1SigB:1RsbW-Komplex handelt.



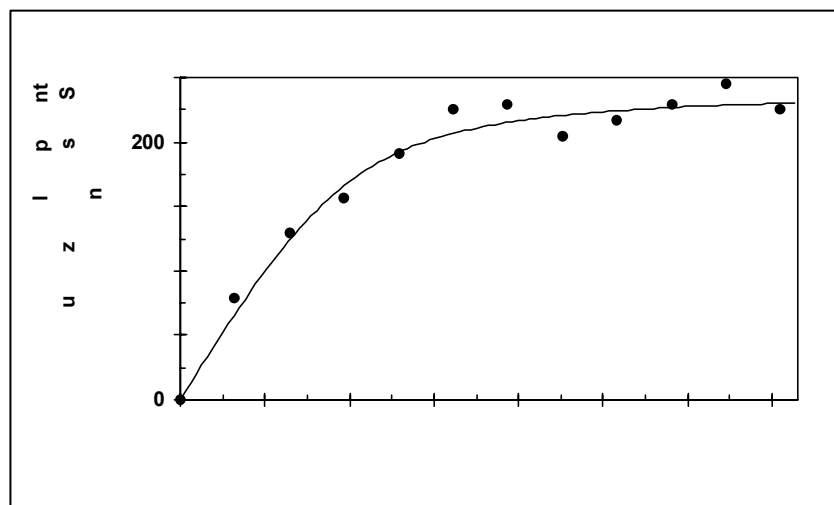
**Abb. 13 Analyse der Stöchiometrie der RsbW/SigB Komplexe**

Die Menge an konstant gehaltenem Partner (RsbW) betrug 0,5 nmol. In der Legende entsprechen 0,5 nmol=1. Das in der Menge variierte Protein ist mit einem Rechteck gekennzeichnet. Die gereinigten Proteine wurden gemeinsam in GF-Puffer 10 min bei 37°C inkubiert. Der Mix wurde in 2x nativem Probenpuffer aufgenommen und im 12,5%igen Nativgel aufgetrennt: RsbW konstant, SigB variiert.

#### 4.1.4.3. Untersuchung der RsbW/SigB-Stöchiometrie durch Fluoreszenzmessung

Eine andere Methode die Komplexbildung zu untersuchen, besteht darin, die Fluoreszenzänderung der aromatischen Aminosäure Tryptophan bei einer Extinktion von 280 nm im Fluoreszenzspektrophotometer zu verfolgen. Die Proteinsequenz von SigB enthält zwei Tryptophane, die Sequenz von RsbW ein Tryptophan. Beide Proteine besitzen durch den *Strep*-tag ein zusätzliches Tryptophan. Die Tryptophanemission ändert sich abhängig von der Polarität des umgebenden Mediums. Ein Tryptophan, welches sich in einer hydrophoben Tasche in einem Komplex befindet, wird eine schwächere Emission zeigen, als ein von Wasser umgebenes Tryptophan. Um die Tryptophanfluoreszenz der einzelnen Proteine im Vergleich zur Fluoreszenz nach Komplexbildung zu bestimmen, wurden jeweils

von SigB und RsbW einzeln Eichreihen aufgenommen. Für die Messung der Änderung der Fluoreszenz bei der Komplexbildung wurde jeweils ein Partner in der Küvette vorgelegt und der andere eintitriert. Die Emissionswerte wurden für jeden Punkt aufgezeichnet und die Fluoreszenzänderung durch Subtraktion der Emission der Einzelkomponenten berechnet. Abb. 14 zeigt die integrierte Fluoreszenzänderung. Auf diese Weise wurde eine Kurve erhalten, welche auf die Existenz eines  $\text{RsbW}_2\text{:SigB}_1$  Komplexes hinweist, da die Kurve bei dem 1,5- bis 2-fachen Überschuss an RsbW abknickt. Die Steilheit der Kurve zeigt außerdem, dass es sich bei dem RsbW/SigB-Komplex um eine stabile Bindung handelt.



**Abb. 14 kombinierte Auswertung der SigB/RsbW-Titration in der Fluoreszenzmessung**

Die Messung wurde entsprechend der Beschreibung in Material und Methoden durchgeführt und nach der in Material und Methoden angegebenen Formel berechnet. Die Kurve wurde aus der Titration von RsbW zu SigB erstellt.

#### 4.1.5. Quantitative Western-Blot-Analyse

Für die Komplexbildung zwischen SigB, RsbW und RsbV ist das Verhältnis essentiell, in dem die Proteine vor und nach Stress in der Zelle zueinander vorliegen. Der quantitative Western-Blot erlaubt Aussagen zu den Proteinmengen und es ist möglich, den Faktor zu bestimmen, um den die Konzentration der einzelnen Proteine nach Stress angestiegen war. Es wurden jeweils zwei unabhängige Ethanol-, Hitze- und Salzproben geblottet, wobei immer zwei Kontrollen und die Zeitpunkte 2,5, 5, 7,5, 10 und 15 min aus dem Fenster der maximalen Stressinduktion aufgetragen wurden. Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine wurden definierte Mengen an gereinigtem SigB, RsbW und RsbV als Eichreihe gemeinsam mit den *B. subtilis*-Rohextrakten auf die Blots aufgetragen. Die Intensität der Chemifluoreszenz wurde mit dem Auswertungsprogramm „Image Quant“ bestimmt. Anhand der Eichreihe wurden die ng der Proteine SigB, RsbW und RsbV in den Rohextrakten bestimmt.



**A Exponentielles Wachstum**

Zeit (min)	SigB		RsbW		RsbV	
	Durchschnitt	Abweichung	Durchschnitt	Abweichung	Durchschnitt	Abweichung
0	0,4	0,11	0,80	0,22	1,2	0,49

**B 4% Ethanolstress**

Zeit (min)	SigB		RsbW		RsbV	
	Durchschnitt	Abweichung	Durchschnitt	Abweichung	Durchschnitt	Abweichung
2,5	0,5	0,08	1,1	0,10	1,7	0,41
5	0,6	0,12	2,0	0,20	2,6	0,42
7,5	0,9	0,13	2,6	0,17	3,1	0,23
10	1,2	0,08	3,1	0,41	3,6	0,86
15	1,5	0,16	3,1	0,66	4,0	0,52

**C 48°C Hitzestress**

Zeit (min)	SigB		RsbW		RsbV	
	Durchschnitt	Abweichung	Durchschnitt	Abweichung	Durchschnitt	Abweichung
2,5	0,7	0,02	1,0	0,13	1,8	0,15
5	0,7	0,06	1,3	0,09	2,4	0,11
7,5	0,8	0,06	1,6	0,31	2,6	0,02
10	0,8	0,02	2,0	0,13	2,9	0,04
15	0,8	0,00	2,3	0,49	2,7	0,00

**D 3% Salzstress**

Zeit (min)	SigB		RsbW		RsbV	
	Durchschnitt	Abweichung	Durchschnitt	Abweichung	Durchschnitt	Abweichung
2,5	0,3	0,08	0,6	0,18	0,5	0,00
5	0,3	0,10	0,7	0,19	0,8	0,04
7,5	0,4	0,11	0,8	0,23	0,9	0,04
10	0,5	0,14	1,1	0,22	1,4	0,08
15	0,6	0,13	1,6	0,36	1,7	0,02

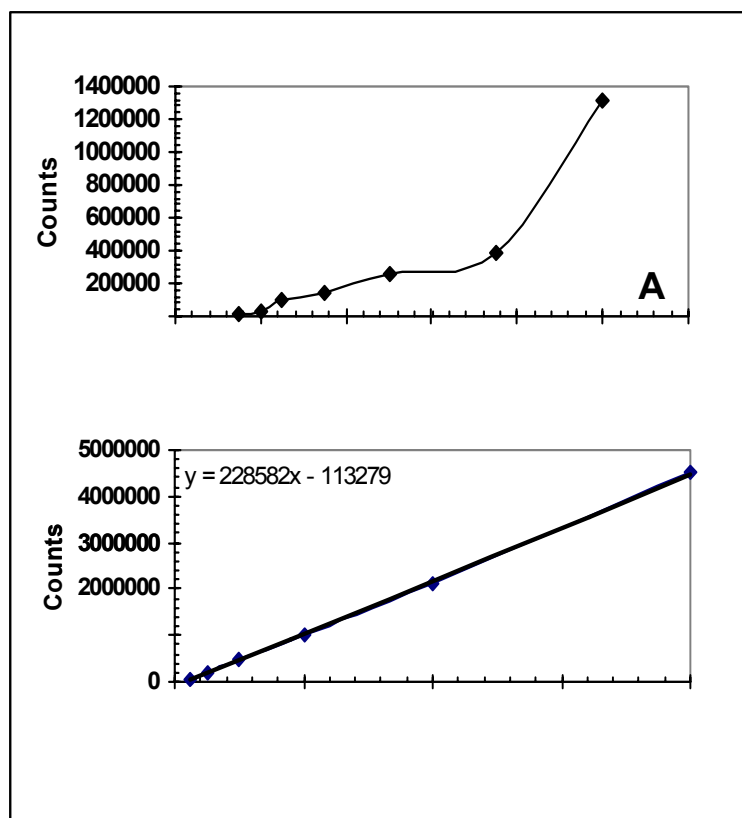
**Tab. 65 Auswertung der quantitativen Western-Blots**

Nach Auswertung der Chemifluoreszenz und Erstellung der Eichreihen erfolgte die Berechnung der ng-Werte für die Rohextrakte. Angegeben sind die Durchschnittswerte und Abweichungen für die Kontrollen und die Stressproben. **A)** exponentielles Wachstum **B)** 4% Ethanolstress **C)** 48°C Hitzestress **D)** 3% Salzstress.

Bei der Durchführung der Methode ergab sich das Problem, dass die Proteinkonzentration in den Eichreihen mit zunehmender Verdünnung nicht wie erwartet linear abnahm, sondern erheblich stärker abfiel. Ein Teil des Eichproteins hatte an die Eppendorfcupwände adsorbiert, wodurch die auf das Gel aufgetragene Proteinkonzentration zu gering ausfiel. Die Qualität der Eichreihen konnte verbessert werden, indem silanisierte Cups verwendet

wurden, was zu einer Verminderung der Adsorption führte. Die Ergebnisse sind in Tab. 65 dargestellt. Dabei konnte aus den erhaltenen Daten geschlossen werden, dass die Proteine vor Stress SigB:RsbW:RsbV im Verhältniss 1:2:4 vorliegen, was sehr gut mit dem bestehenden Modell übereinstimmt. Nach 4% Ethanolstress stieg die Menge der drei Proteine um den Faktor 3-4 an. Die Menge an RsbV war gegenüber RsbW leicht erhöht. 3% Salz- und 48°C Hitzestress führten zu einem 2-3fachen Anstieg der Proteinmenge, wobei RsbW und RsbV hier in gleichem Mengenverhältnis vorlagen.

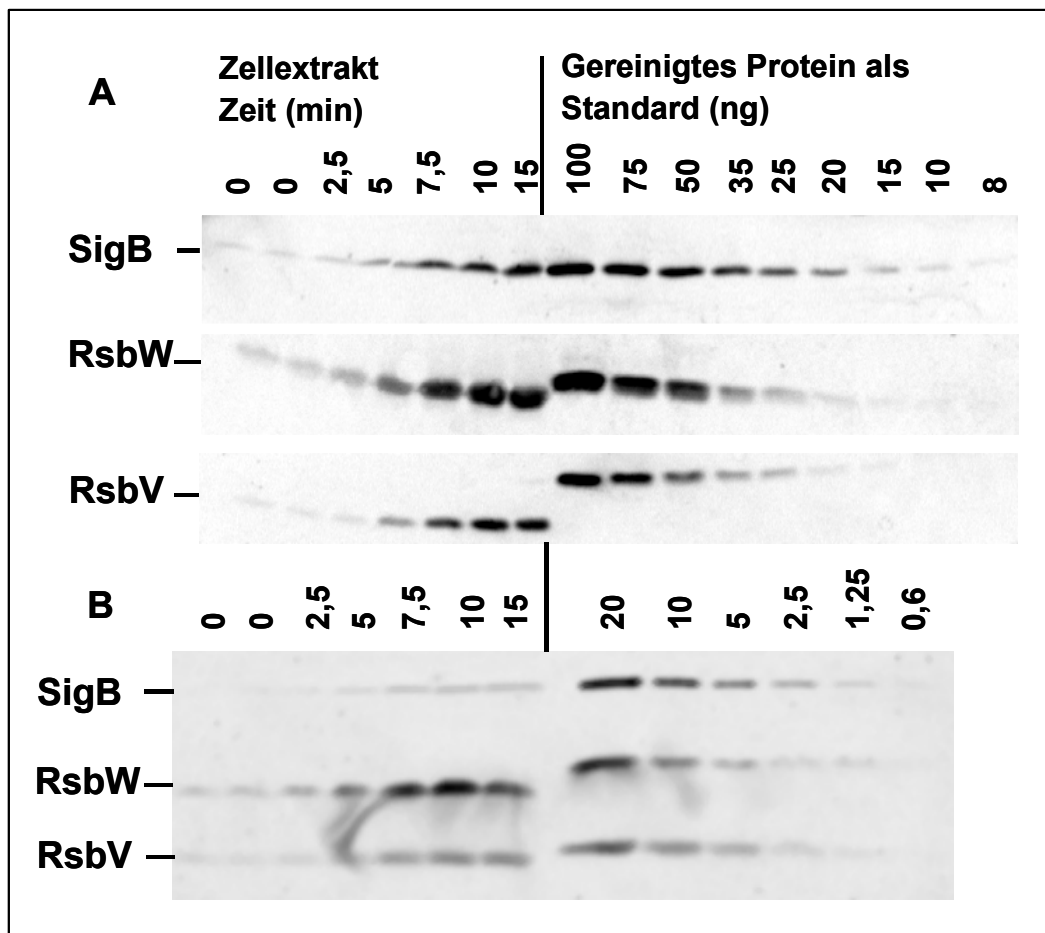
Insgesamt erwies sich aber die Kalkulation der Mengen anhand der Eichreihen als sehr schwierig, da die Werte trotz der silanisierten Cups noch stark schwankten. Diese Versuche wurden am Ende der Promotionszeit noch einmal wiederholt, da es nach unterschiedlichen Versuchsansätzen gelungen war, völlig lineare Eichreihen zu erhalten (Abb. 15), was eine erheblich bessere Auswertung der Konzentrationen ermöglichte.



**Abb. 15 Optimierung der Eichreihen für die quantitativen Western-Blot-Analysen**

Es wurden 60 µg Rohextrakt pro Spur aufgetragen. Die Konzentration der für die Eichreihe verwendeten Proteinlösungen wurden photometrisch bei 280 nm bestimmt und über den Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Proteins berechnet. Für die Eichproteine wurden die in der Beschriftung angegebenen Mengen an Protein aufgetragen. Die Blots wurden mit monoklonalen Antikörpern detektiert. **A)** Die Extrakte wurden auf ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Verdünnungsreihe der Eichproteine wurde in GF-Puffer in silanisierten Cups angelegt. **B)** Optimierte Eichreihe: Die Verdünnung wurde in 2x SDS-Probenpuffer in Cups mit Silanbeschichtung durchgeführt.

Die Adsorption des Eichproteins an die Wand konnte in diesen Ansätzen vermieden werden, indem die Verdünnungsreihen in zweifach SDS-Probenpuffer durchgeführt wurden, dem außerdem 0,5 mg/ml BSA als „Trägerprotein“ zugesetzt worden war. Bei der Auswertung der neuen Blots stellte sich heraus, dass die Eichreihen nach diesem Verfahren absolut linear und sehr gut reproduzierbar waren. Abb. 15 zeigt deutlich die Optimierung der Eichreihen im Vergleich zu den vorher erzielten Ergebnissen.



**Abb. 16 Quantitative Western-Blots**

Für die Bestimmung der Zellextrakte wurden 60 µg pro Spur eingesetzt. Die Eichproteine wurden entsprechend der Legende verdünnt aufgetragen. **A)** Die Proteine wurden auf 12,5%ige SDS-Midigele aufgetragen. **B)** Die Blots mit der optimierten Eichreihe wurden mit Hilfe von 12,5%igen Minigelen angefertigt.

Leider war es zeitlich nicht mehr möglich, neue Extrakte durch nochmaliges Kultivieren zu gewinnen. Nach Auswertung der neuen Blots zeigte sich, dass die Proteinkonzentration der Extrakte, wahrscheinlich durch die lange Lagerungszeit, im Vergleich zu früheren Blots erheblich reduziert war (Abb. 16 ) und daher keine verlässlichen Aussagen über die Proteinmenge im Rohextrakt erlaubten. Abb. 16 zeigt deutlich, dass die Konzentration aller drei Proteine, aber insbesondere an SigB, stark abgenommen hatte. Die Laufunterschiede zwischen den Eichproteinen und den Proteinen aus dem Rohextrakt sind durch die erhöhte

molekulare Masse der mit einem *Strep*-tag versehenen Proteine begründet. Der Unterschied macht sich daher besonders bei dem kleinen RsbV-Protein in Abhängigkeit von der Trennstrecke bemerkbar.

Es war gelungen, die Durchführung der quantitativen Blots zu etablieren. Um verlässliche Mengenbestimmungen durchführen zu können, werden die Blots mit neuen Extrakten wiederholt werden müssen.

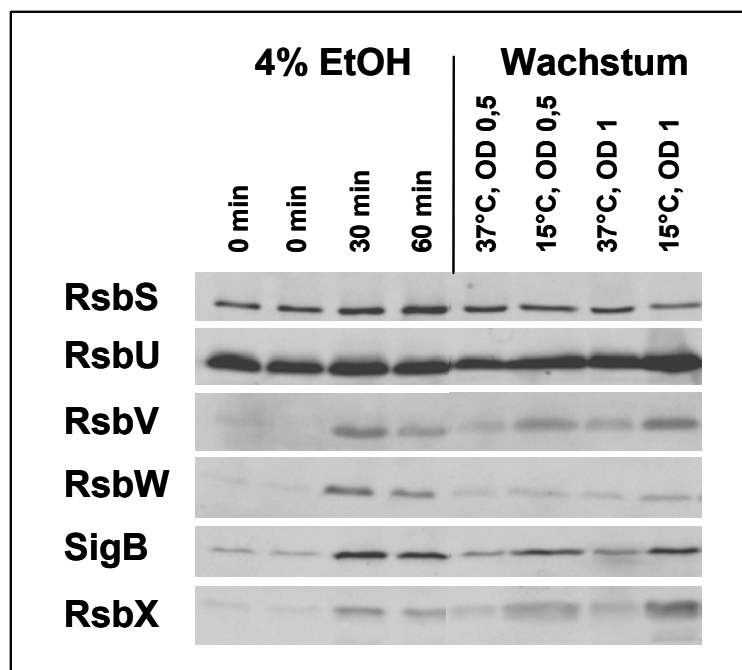
#### 4.1.6. Versuche zur Kristallisierung des Sigmafaktors SigB

Es existiert bisher noch keine vollständige Kristallstruktur eines Sigmafaktors. Von Campell und Darst (2000) wurden eingehende, biochemische Untersuchungen des ähnlichen SigF/SpoIIAB-Komplexes durchgeführt, unter anderem mit Hilfe der Elektronenspray-Massenspektroskopie. Weitere Methoden waren Gelfiltration, N-terminale Sequenzierung und limitierte Proteolyse, welche insgesamt den Schluss zuließen, dass es sich hierbei um einen SigF<sub>1</sub>:SpoIIAB<sub>2</sub>-Komplex handelt. Es war also aus zwei Gründen attraktiv zu versuchen, SigB im Komplex mit RsbW zu kristallisieren: Erstens führte die Einbindung von SigB im Komplex möglicherweise zu dessen Stabilisierung und ermöglichte dadurch die Bildung von Kristallen. Zweitens wären Analysen des Komplexes selbst möglich. Daher wurden in Kooperation mit Milton Stubbs erste Versuche zur Kristallisation unternommen. Für die Kristallisation wurden beide Proteine im Anschluss an das in Material und Methoden beschriebene Reinigungsprotokoll zusätzlich einer Gelfiltration über eine Superdex 75 unterzogen. Die Komplexbildung wurde durch eine gemeinsame Inkubation erreicht. Der Komplex konnte von nicht in den Komplex eingegangenen, einzelnen Proteinen durch eine erneute Gelfiltration sauber abgetrennt werden. Der Komplex wurde in 20 mM Hepes aufgenommen und frisch für die Kristallisation eingesetzt. Dabei wurde der Komplex entsprechend einem Standardscreening mit unterschiedlichen Puffern inkubiert, um Bedingungen zu finden, welche eine Kristallbildung erlauben. Es musste allerdings nach mehreren Versuchen festgestellt werden, dass mit den Standardpuffern keine Kristallbildung erreicht werden konnte, da die Proteine entweder aggregierten und ausfielen oder die Pufferlösung vollkommen klar blieb. Mittlerweile sind die Regulatoren RsbV, RsbW und RsbS von Lewis (unveröffentlichte Daten) kristallisiert worden.

## 4.2. Untersuchungen zur Regulation der SigB-Aktivität bei Wachstum in der Kälte

### 4.2.1. SigB-Induktion bei Wachstum in der Kälte

Von Hoffmann et al. (unveröffentlichte Daten) wurde durch 2D-Gel-Elektrophorese nachgewiesen, dass SigB bei Kältewachstum (15°C) von *B. subtilis* in Minimalmedium aktiv ist. In dem kältetoleranten, als Lebensmittelvergifter bekannten Bakterium *Listeria monocytogenes*, wurde von Becker et al. (2000) ein zu *sigB* sehr ähnliches Gen gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass SigB in *Listeria monocytogenes* bei exponentiell wachsenden Kulturen an der Kälteadaptation beteiligt ist und unter bestimmten Bedingungen ein Wildtyp deutliche Vorteile gegenüber einer *sigB*-Mutante besitzt. (Becker et al. 2000). Die folgenden Untersuchungen in dieser Arbeit hatten zum Ziel, einen Einblick in die Regulation von SigB während des Wachstums in der Kälte zu erhalten.



**Abb. 17 Western-Blot: SigB-Aktivität bei Wachstum in der Kälte**

Der *B. subtilis*-Wildtyp 168 wurde in SMM bei 37°C kultiviert, in der exponentiellen Phase geteilt und eine Hälfte mit Ethanol (4% EK) behandelt. Eine weitere Wildtypkultur wurde in SMM bei 15°C gezogen. Ein Teil wurde bei OD<sub>540</sub>=0,5 geerntet, der andere bei 1,0. 60 µg Proteinrohextrakt wurden nach Auftrennung in einer SDS-PAGE einer Western-Blot-Analyse mit monoklonalen Antikörpern gegen RsbU, RsbS, RsbV, RsbW und SigB unterzogen.

Zur Übersicht soll der Western-Blot (Abb. 17) die durch das Wachstum in der Kälte induzierte Produktion von SigB, RsbW, RsbV und RsbX im Wildtyp (168) im Vergleich zum Basalniveau bei 37°C veranschaulichen. Als Beispiel für die Akkumulation dieser Proteine in Folge eines

starken Stresses wurde ein Wildtypstamm (168) aufgetragen, welcher mit 4% Ethanol (Positivkontrolle) behandelt worden war. Die Regulatoren RsbU und RsbS bleiben in ihrer Menge vor und nach Stress unverändert. Daher konnten RsbU und RsbS in den Western-Blots als Indikator dafür dienen, dass sich in allen Spuren äquivalente Proteinmengen befanden. In dieser Analyse (Abb. 17) konnten die Ergebnisse von Hoffmann et al. bestätigt werden, dass die Menge der Proteine SigB, RsbW, RsbV und RsbX bei Wachstum in der Kälte gegenüber einer 37°C-Kultur deutlich erhöht ist. Die Intensität der Signale ist dabei vergleichbar mit einer ethanolgestressten Kultur.

#### 4.2.1.1. Einfluss des Kältewachstums auf die Regulation von SigB

SigB wird im Wildtyp während des Wachstums bei 15°C induziert. Studien von Tamara Hoffmann zeigten (persönliche Kommunikation), dass das Wachstum einer *sigB*-Mutante bei 15°C teilweise beeinträchtigt ist. Um den SigB<sup>-</sup>-Stamm trotzdem für weitere Untersuchungen als Negativkontrolle verwenden zu können, wurde die Temperatur auf 16°C erhöht. Western-Blot-Analysen untermauerten, dass diese Temperatur permissiv für eine starke Kälteanschaltung beim Wildtyp war und gleichzeitig das uneingeschränkte Wachstum der SigB<sup>-</sup>-Mutante ermöglichte. Es stellte sich als zusätzlicher positiver Nebeneffekt heraus, dass alle Stämme bei 16°C ein insgesamt schnelleres Wachstum zeigten.

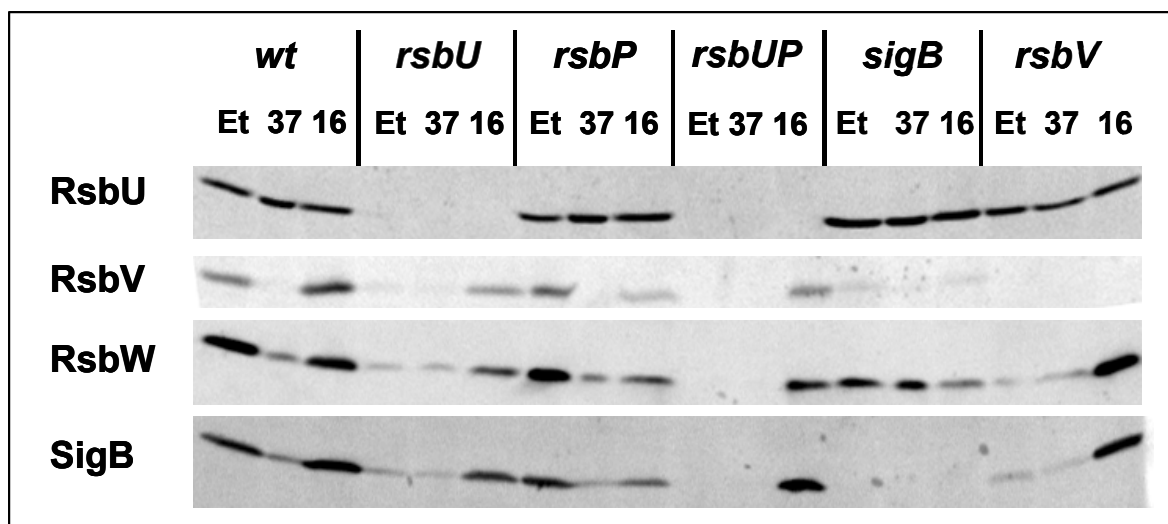
Um der Frage nachzugehen, wie die SigB-Aktivität bei Wachstum in der Kälte reguliert wird, war es nun von besonderem Interesse, zu prüfen, welche der bisher bekannten Regulatoren für die Weiterleitung der Kältesignale und letztendlich für die Induktion von SigB notwendig sind. Da Kälte ebenso wie Hitze ein Temperatursignal darstellt, wurde vermutet, dass es sich hier um ein weiteres klassisches Beispiel für Umweltstress handelt, welches über die RsbU-Phosphatase zur Dephosphorylierung von RsbV führt.

Die Untersuchungen wurden mit bereits vorhandenen Stämmen durchgeführt, in welchen einzelne Regulatoren (RsbU<sup>-</sup>, RsbP<sup>-</sup>, RsbUP<sup>-</sup>, RsbV<sup>-</sup>) inaktiviert sind. Die Untersuchungen wurden auf Proteinebene (Western-Blot, 2D-Gele) und auf Transkriptionsebene (*ctc::LacZ*-Fusion) durchgeführt. Vergleichende 2D-Gel-Untersuchungen unterschiedlicher *B. subtilis*-Wildtypstämme (IS58, BSA46, 168) hatten ergeben, dass diese nicht mit gleicher Intensität auf Stress wie z.B. Ethanol oder Hitze reagieren (Andrea Völker 1999). Um die verschiedenen Mutanten vergleichen zu können, sollten die Mutanten alle den für die bisherigen Kältestudien verwendeten Wildtyp (168) als gemeinsamen, genetischen Hintergrund aufweisen. *rsbU*-, *rsbV*- und *sigB*-Mutanten lagen bereits im 168 vor, während die chromosomale DNA der anderen Mutanten durch Transformation in den WT 168

übertragen wurde. Für die LacZ-Messung erhielten die so hergestellten Stämme durch Transformation mit chromosomaler DNA aus BSA46 zusätzlich eine *ctc::LacZ*-Fusion (BSM151, BSM153-BSM159). Zur Herstellung von Mehrfachmutanten [BSM153 (*rsbUP*) und BSM158 (*rsbUVP*)] wurde chromosomale DNA von *RsbP*<sup>-</sup> in folgende Stämme eingebracht: in BSM149 (*rsbU*) und in BSM157 (*rsbUV*).

#### 4.2.1.2. Analyse der Mutanten im Western-Blot

Wie im Western-Blot in Abb. 18 illustriert, wurden Proben der Phosphatase-Einzelmutanten *rsbU*, *rsbP*, die Doppelmutante *rsbUP* und eine Anti-Antisigma-Mutante *rsbV* zusammen mit dem Wildtyp und einer *sigB*-Mutante untersucht. Um entscheiden zu können, ob die Intensität der Banden dem Basalniveau oder einer Induktion entspricht, wurde von jedem Stamm neben dem interessierenden 16°C-Extrakt auch ein 37°C-Extrakt, welcher das Basalniveau repräsentierte, und eine mit 4% Ethanol gestresste Probe (=Positivkontrolle) aufgetragen und geblottet. Die uniforme Bandestärke von *RsbU*, welches unter den bisher getesteten Bedingungen praktisch nicht induzierbar ist, bestätigte, dass in jeder Spur gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden.



**Abb. 18 Western-Blot-Analyse der SigB-Induktion bei Wachstum in der Kälte**

Isogene *B. subtilis*-Stämme wurden bei 37°C und 16°C in der exponentiellen Phase geerntet. Eine weitere Kultur wurde jeweils mit 4% Ethanol behandelt und nach 1 h geerntet. Für alle Kultivierungen wurde SMM verwendet. Für die Analyse im SDS-PAGE wurden 60 µg Probe aufgetragen. Nach dem Western-Blot-Verfahren wurden monoklonale Antikörper zur Detektion verwendet.

Die verwendeten Stämme waren: BSM151 (WT), BSM154 (*rsbU::kan*), BSM159 (*rsbP::spc*), BSM153 (*rsbU::kan rsbP::spc*), BSM156 (*sigB::spc*), BSM155 (*rsbV312::X::pWH25*)

Erwartungsgemäß zeigte der Wildtyp sowohl bei 16°C als auch nach Ethanolstress eine deutliche Akkumulation von SigB, RsbW und RsbV. Die *rsbU*-Mutante (die Ausschaltung von

*rsbU* ist durch das fehlende RsbU-Antikörpersignal belegt) zeigt phänotypisch keine Reaktion mehr auf Umweltstress. Entsprechend konnte im Western-Blot neben der Negativkontrolle 37°C auch im Ethanolextrakt keine Induktion festgestellt werden. Im Vergleich dazu war in der 16°C-Probe eine sehr deutliche Akkumulation von SigB, RsbW und RsbV zu sehen. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Kältesignal nicht durch die Umweltstress integrierende Phosphatase RsbU transferiert wird.

Daraufhin wurde die *rsbP*-Mutante untersucht. Eine *rsbP*-Mutante ist zwar nicht mehr in der Lage auf Energielimitation zu reagieren, ist aber in der Weiterleitung von RsbP-unabhängigem Umweltstress (Umweltstress ist allein RsbU-abhängig) nicht limitiert und zeigt daher noch Induktion bei Ethanolstress. Unerwarteter Weise verhinderte aber auch ein Fehlen dieser Phosphatase nicht die SigB-abhängige Kälteantwort, wie an den stark induzierten SigB-, RsbV- und RsbW-Banden zu ermitteln war. Bemerkenswerter Weise handelt es sich bei Wachstum in der Kälte um das erste untersuchte Signal, welches unabhängig von den beiden Phosphatasen RsbU und RsbP die Induktion von SigB herbeiführt.

Da ein Fehlen der einzelnen Phosphatasen definitiv keinen Einfluss hatte, sollte geklärt werden, ob sich die Phosphatasen aufgrund von Redundanz in Bezug auf Wachstum in der Kälte möglicherweise gegenseitig ersetzen können. Deshalb wurden beide Phosphatasen (*rsbUP*) ausgeschaltet. Wie in Abb. 18 zu sehen, war trotzdem noch eine Induktion bei Kälte möglich. Erstaunlicherweise erfolgte die Regulation bei Wachstum in der Kälte also über keinen der beiden bekannten Induktionswege Umweltstress oder metabolischen Stress.

Als Negativkontrolle wurde eine *sigB*-Mutante überprüft. Das fehlende SigB-Antikörpersignal bestätigte den *sigB*-Genotyp. Die *sigB*-Mutante zeigte wie erwartet keine Akkumulation von RsbV. RsbW lag im Vergleich zu früheren in LB durchgeführten Versuchen in einem etwas erhöhtem Basalniveau vor.

Unter Berücksichtigung dieses Kenntnisstandes wurde die Anti-Antisigmafaktor-Mutante (RsbV<sup>-</sup>) in die Analyse mit einbezogen. Ein Fehlen des Anti-Antisigmafaktors führte bei allen bisher bekannten, SigB-aktivierenden Stressarten in jedem Fall zu einem Ausfall der SigB-Antwort. Das in allen drei Proben im Western-Blot fehlende RsbV-Antikörpersignal belegte, dass es sich bei dem hier untersuchten Stamm um eine *rsbV*-Mutante handelte, welche entsprechend auch keine Anschaltung bei Ethanolstress zu zeigen vermochte. Abb. 18 zeigt eindeutig, dass SigB in der *rsbV*-Mutante bei Wachstum in der Kälte voll induziert ist.



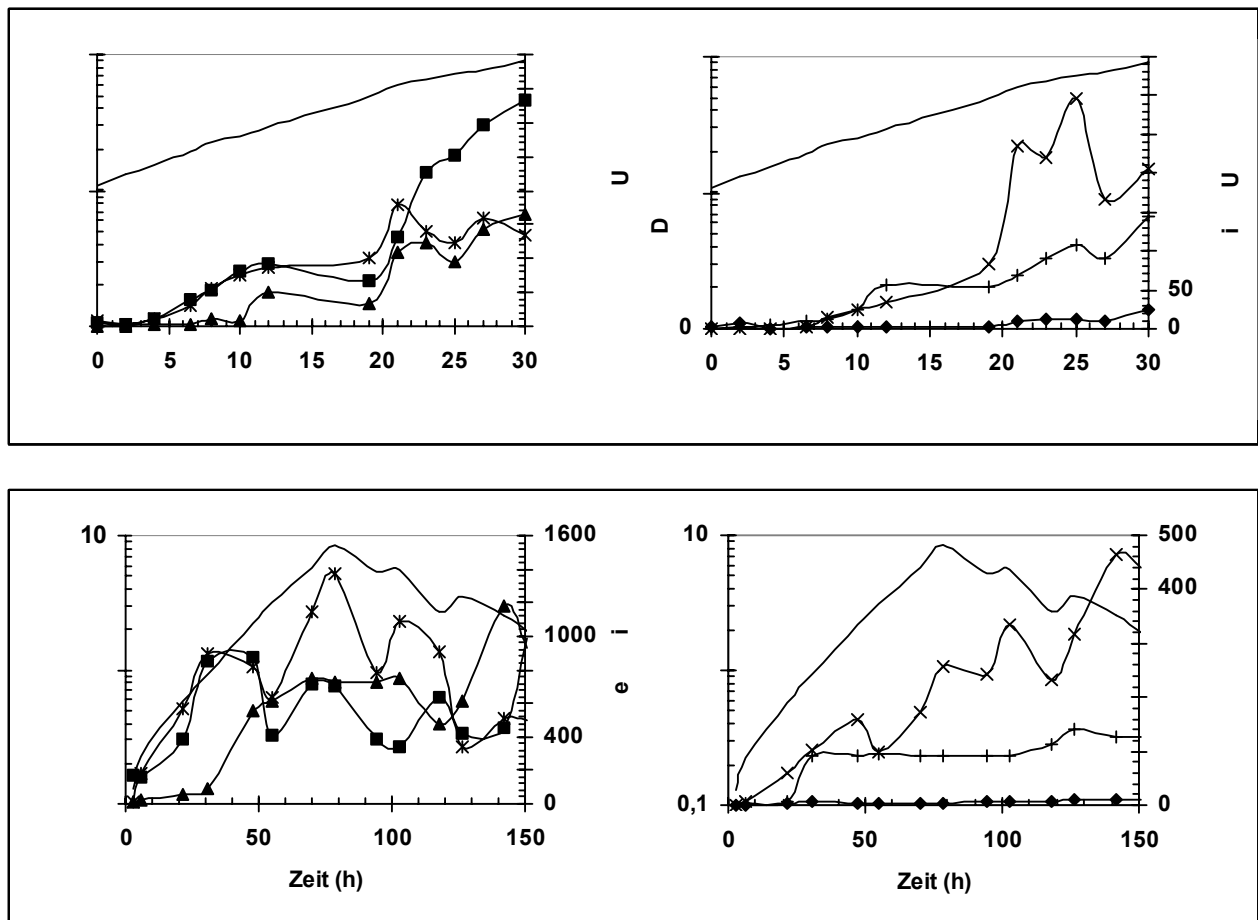
Als Gesamtergebnis kann zusammenfassend festgehalten werden, dass es sich bei Wachstum in der Kälte um einen RsbU, RsbP und RsbV-unabhängigen, neuen Weg der Regulation handelt.

#### 4.2.1.3. LacZ-Bestimmung zur Analyse der Mutanten

Die Ergebnisse aus den Western-Blot-Analysen der Kälteextrakte waren äußerst unerwartet, da sie in das momentan bestehende Modell der SigB-Regulation nicht einzuordnen waren, sondern einen dritten Weg der SigB-Induktion darstellten. Daher sollten die bisher erworbenen Daten durch eine zweite, unabhängige Methode bestätigt und erweitert werden. Die hierfür durchgeführte LacZ-Aktivitätsbestimmung ermöglichte, neben der Überprüfung der Anschaltung, auch eine Bestimmung des Zeitpunktes der SigB-Induktion nach dem Umsetzen und deren Quantifizierung während des Wachstumsverlaufes in der Kälte.

Für die Messungen wurden von jedem Stamm nach der beschriebenen Methode zwei parallele Kulturen gezogen, welche aus derselben Übertagkultur angeimpft worden waren. Zur Bestimmung des Zeitpunktes der SigB-Induktion nach dem Umsetzen ( $=t_0$ ) von 37°C zu 16°C wurden im Zeitraum 0-30 h (Abb. 19 A und B) in engen Abständen Proben aus der ersten Kultur für die LacZ-Bestimmung genommen und danach der Rest dieser Kultur verworfen, da wegen der häufigen Probennahme ein erhöhtes Risiko der Unsterilität bestand. Für die Beobachtung der LacZ-Aktivität während des Wachstums und zur Quantifizierung der Anschalthöhe wurden zwei Proben pro Tag für die LacZ-Messung im Zeitraum 0-150 h (Abb. 19 C und D) aus dem zweiten Kolben entnommen.

Alle Stämme verdoppelten sich in den ersten sechs Stunden nach dem Umsetzen von 37°C auf 16°C noch einmal, bevor sich die Verdopplungszeit auf 15-25 h verlangsamte. Die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Mutanten variierte in den einzelnen Versuchsansätzen, aber im Schnitt erreichten alle zwischen 35-55 h eine OD von 1 und wuchsen bis zu einer OD von 7,5. Die untersuchten Stämme zeigten alle einen ähnlichen Kurvenverlauf. Zur besseren Übersicht wurde daher nur die Wachstumskurve des Wildtyps, symbolisiert als durchgehende Linie, in die Diagramme aufgenommen. Die meisten LacZ-Proben der höheren OD's zeigten im Test extrem hohe Anschaltwerte, die im Bereich von 150 MU bis maximal 1000 MU lagen. Für die Bestimmung derart hoher Werte wurden die Proben vor Zugabe von ONPG 1:10 bzw. 1:100 mit LacZ-Puffer verdünnt.



**Abb. 19 Bestimmung der Aktivität von SigB bei Wachstum in der Kälte durch Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität einer *ctc::lacZ*-Reportergenfusion**

Isogene *B. subtilis*-Stämme, welche eine *ctc::lacZ*-Reportergenfusion in der SP $\beta$ -Stelle im Chromosom tragen, wurden in SMM-Minimalmedium kultiviert. Die Stämme wurden bei 37°C bis zur exponentiellen Phase,  $OD_{540}=0,5$  gezogen, auf 0,1 verdünnt und zu 16°C umgesetzt. Für die Bestimmung der OD und der *ctc::lacZ*-Expression wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Die  $\beta$ -Galaktosidasebestimmung wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die durchgehende Linie zeigt den Wachstumskurvenverlauf für den Wildtypstamm BSM151 stellvertretend für die übrigen Stämme, welche ein ähnliches Wachstum zeigten.

**A) und B) 0-30 h C) und D) 0-150 h.**

Eingesetzte Stämme: ■ BSM151 (WT), ♦ BSM156 (*sigB::spc*), ▲ BSM155 (*rsbV312::X::pWH25*), \* BSM154 (*rsbU::kan*), × BSM159 (*rsbP::spc*), + BSM153 (*rsbU::kan rsbP::spc*)

Wie in Abb. 19 (B und D) aufgezeichnet, zeigte die *sigB*-Mutante erwartungsgemäß keine Anschaltung der *ctc::lacZ*-Fusion. Es konnte ein Basalniveau von 0,3-12 MU festgestellt werden. Der Wildtyp und die *rsbU*-Mutante (Abb. 19 A und C) zeigten zwar sofort nach dem Umsetzen eine geringe *ctc::lacZ*-Anschaltung, die aber nach einer Stunde wieder auf das Basalniveau gefallen war. Diese kurzfristige Erhöhung war auf Sauerstoffmangel und den Stress des Umsetzens selbst zurückzuführen und nicht auf die Temperaturänderung. Mit Ausnahme der *sigB*-Mutante zeigten alle getesteten Stämme nach vier bis sechs Stunden

eine schwache, initiale Anschaltung und bei etwa 20 Stunden eine rasch zunehmende, starke *ctc::lacZ*-Anschaltung. 30-40 h nach dem Umsetzen erreichten sowohl der Wildtyp, als auch die *rsbV*- und *rsbU*-Mutanten (Abb. 19 A-D) ihr Maximum in der LacZ-Anschaltung. Die gemessenen Werte blieben mit einigen Schwankungen auf diesem sehr hohen Anschaltungsniveau über den gesamten Messbereich bestehen. Zur Erklärung der Schwankungen ist denkbar, dass es sich dabei einerseits tatsächlich um einen zyklischen Rhythmus von Abfall und Wiederanschaltung der Induktion handelt, was dem bisher beschriebenen transienten Charakter der SigB-Induktion entsprechen würde. Andererseits kann nicht absolut ausgeschlossen werden, dass es sich um durch die hohe Verdünnung entstandene Messfehler handelt.

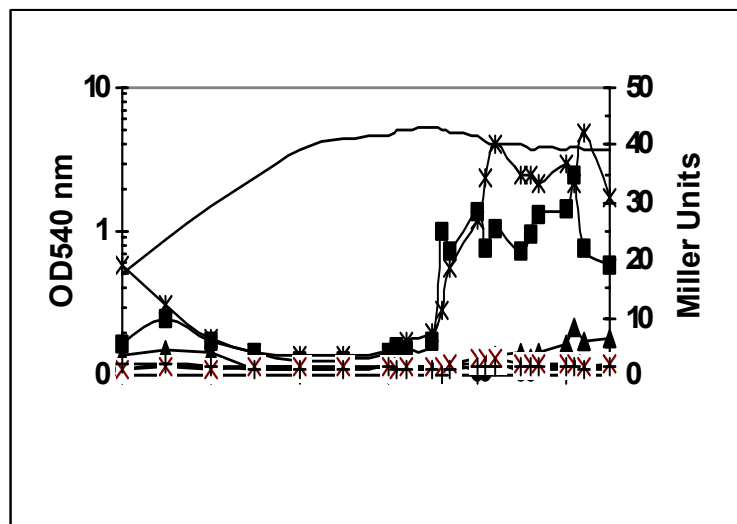
Die *rsbP*- und *rsbUP*-Mutanten zeigten nach 30 h (Abb. 19 C und D) ebenfalls hohe LacZ-Werte, aber bei diesen Mutanten war noch eine Steigerung der Anschaltung bis ca. 75 h nach dem Umsetzen zu beobachten. Damit erreicht die maximale LacZ-Antwort bei 16°C etwa vierfach höhere Werte bei der *rsbP*-Mutante und 17fach höhere Werte beim Wildtyp und der *rsbV*-Mutante im Vergleich zu den mit 80 MU stark induzierenden Stressarten 4% Ethanol oder stationäre Phase-Anschaltung. Die Ergebnisse bestätigten die Western-Blot-Analysen. Zur Kontrolle wurde in den LacZ-Studien die Tripelmutante BSM158 (*rsbUVP*) einbezogen (Daten nicht gezeigt). Entsprechend den oben erhaltenen Daten war auch diese Mutante voll induzierbar.

#### 4.2.2. Einfluss des Minimalmediums SMM auf die LacZ-Aktivität

Alle bisherigen Untersuchungen zur SigB-Antwort wurden standardmäßig in LB oder in Belitzky-Minimalmedium durchgeführt, so dass für SMM keine weiteren Daten in Bezug auf die SigB-Induktion vorliegen. Um zu überprüfen ob die LacZ-Aktivität durch das Medium SMM selbst in irgendeiner Weise beeinflusst wurde, sollten zur Kontrolle die gut untersuchten Stressarten 4% Ethanol und die stationäre Phase-Anschaltung bei 37°C in SMM vermessen werden. Zur Bestimmung der exponentiellen Phase und des Beginns der stationären Phase bei 37°C wurde eine Wachstumskurve vom Wildtyp und der *RsbV*-Mutante (BSM155) in SMM aufgenommen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Kulturen in SMM bei 37°C bis einschließlich einer OD von 2,5 exponentiell wachsen, dann langsam abknicken und bei einer OD von 4,5 (ca. 8,5-9 h nach dem Animpfen auf eine OD von 0,1) in die stationäre Phase übergehen.

#### 4.2.2.1. Messung der *ctc::LacZ*-Fusion

Für die Messung der stationären Phase-Antwort wurden, wie in Abb. 20 zu sehen, alle Stämme überprüft, welche auch in der Kälte untersucht worden waren. Wie erwartet, zeigten nur *RsbU*<sup>-</sup> und der Wildtyp die Anschaltung, weil die stationäre Phase-Anschaltung bei den anderen Mutanten (*rsbV*, *rsbP*, *rsbUP*) bei 37°C blockiert oder wie bei *SigB*<sup>-</sup> nicht vorhanden ist. Die Induktion der Antwort entspricht mit 40 MU der in Belitzky-Medium gemessenen Expression. Die *sigB*-Mutante zeigt bei 37°C mit 0,6-1,9 MU ein niedrigeres Basalniveau als bei 16°C, was darauf zurückzuführen ist, dass die  $\beta$ -Galaktosidase bei 16°C wahrscheinlich stabiler ist. Dass die Stabilität der  $\beta$ -Galaktosidase durch die Temperatur beeinflusst wird, ist aus Hitzexperimenten (48°C) bekannt, wo ein spezielles, thermostabiles Enzym eingesetzt wird, da die normalerweise verwendete  $\beta$ -Galaktosidase instabil ist.



**Abb. 20 Induktion von *ctc::lacZ* in der stationären Phase**

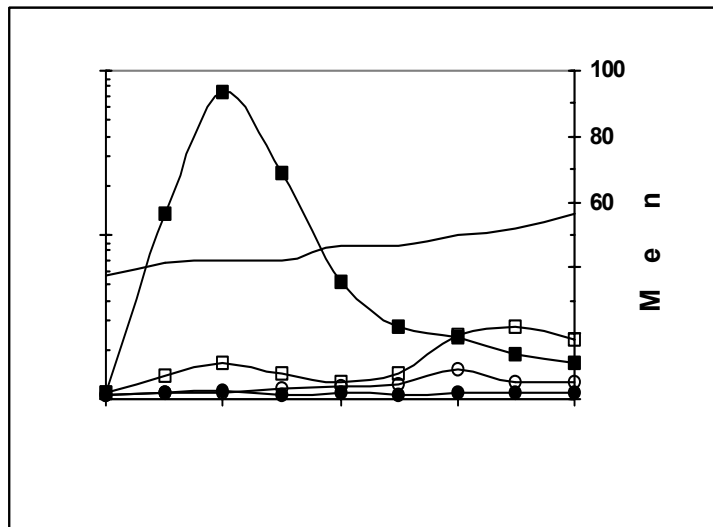
Von isogenen *B. subtilis*-Stämmen wurde bei 37°C im Minimalmedium SMM eine Wachstumskurve beginnend in der exponentiellen Phase  $OD_{540}=0,5$  bis einschließlich der stationären Phase aufgenommen. In den gekennzeichneten Abständen wurden Proben für die  $\beta$ -Galaktosidasebestimmung geerntet. Da die Wachstumskurve bei allen Stämmen fast identisch war, ist hier nur der Wachstumsverlauf des Wildtyps BSM151 gezeigt (symbolisiert als durchgehende Linie).

Verwendete Stämme: ■ BSM151 (WT), ◆ BSM156 (*sigB::spc*), ▲ BSM155 (*rsbV312::X::pWH25*),

\* BSM154 (*rsbU::kan*), × BSM159 (*rsbP::spc*), + BSM153 (*rsbU::kan rsbP::spc*)

Aufgrund der in Abb. 20 erhaltenen Ergebnisse konnte die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase bei Ethanolstress (Abb. 21) auf den Wildtyp und die *rsbV*-Mutante beschränkt werden. Die eine Hälfte der Kultur wurde durch Ethanolzugabe induziert während der andere Teil als Kontrolle parallel kultiviert wurde.

Die Induktion wurde von 0 bis 80 min verfolgt, wobei die Ethanolzugabe dem Zeitpunkt  $t_0$  entspricht. Für die Messung wurden beiden Kulturen im 10 min-Takt Proben entnommen. Der Wildtyp erreicht, abzüglich der in der Kontrollkultur erhaltenen Basalwerte, nach 20 min eine maximale Anschaltung von 80 MU während die mit Ethanol behandelte *rsbV*-Mutante, wie erwartet, bei 37°C keine Induktion zeigte. Diese Versuche stimmen in Bezug auf die Induktionsstärke der LacZ-Anschaltung mit früheren Daten in LB (Völker et al. 1995 b) überein.



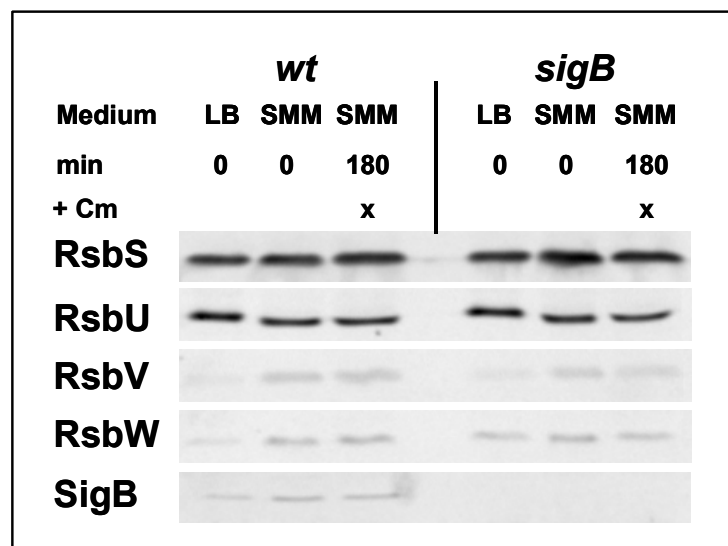
**Abb. 21 Induktion von *ctc::lacZ* bei Ethanolstress**

Der Wildtypstamm BSM151 und die *rsbV*-Mutante (BSM155) wurden in SMM bei 37°C kultiviert. Beide Stämme tragen eine *ctc::lacZ*-Fusion. Während der exponentiellen Phase wurden die Kulturen geteilt. Eine Hälfte wurde sofort nach der Teilung mit 4% Ethanol ( $t_0$ ) behandelt während die andere Hälfte als Kontrolle diente. Von  $t_0$  bis  $t_{80}$  wurden im 10 min-Takt Proben entnommen. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde entsprechend der Beschreibung in Material und Methoden bestimmt. Offene Symbole kennzeichnen die Kontrolle, geschlossene Symbole stehen für die gestresste Kultur  
Stämme: ■/□ BSM151 (WT), ○/◐ BSM155 (*rsbV312::X::pWH25*)

#### 4.2.2.2. Einfluss von SMM auf das Basalniveau von SigB, RsbW und RsbV

Die in SMM kultivierte *sigB*-Mutante schien im Western-Blot (Abb. 22) im Vergleich zu früheren Blots ein etwas höheres Basalniveau an RsbW und RsbV sowohl in der 37°C-, 16°C- als auch in der Ethanolprobe zu zeigen. Da alle vorangegangenen Studien in LB durchgeführt worden sind, sollte hier untersucht werden, ob das Basalniveau von SigB, RsbW und RsbV in SMM, unabhängig von einer SigB-Induktion, im Vergleich zu LB möglicherweise etwas erhöht ist (Abb. 22). Dazu wurden der WT und die *sigB*-Mutante parallel bei 37°C jeweils in LB und SMM kultiviert und bei einer OD von 0,5 geerntet. Ein Vergleich der Extrakte im Western-Blot zeigte deutlich, dass der WT eine etwas stärkere Akkumulation aller drei Regulatoren im SMM-Extrakt im Vergleich zum LB-Extrakt zeigte.

Ebenso konnte für die SigB<sup>-</sup>-Mutante ein etwas erhöhtes Basallevel an RsbW und RsbV in SMM festgestellt werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass in SMM eine etwas erhöhte Akkumulation aller drei Regulatoren zu finden ist, welche SigB-unabhängig ist und somit keinen negativen Einfluss auf die weiteren Experimente hat. Wie Abb. 22 außerdem zeigt, konnte durch Zugabe einer wachstumshemmenden Menge an Chloamphenicol (50 mg/ml) zu den SMM-Kulturen und einer Inkubation für 180 min ausgeschlossen werden, dass sich die Menge der Regulatoren weder in der *sigB*-Mutante noch im WT bei 37°C in SMM durch Abbau ändert.



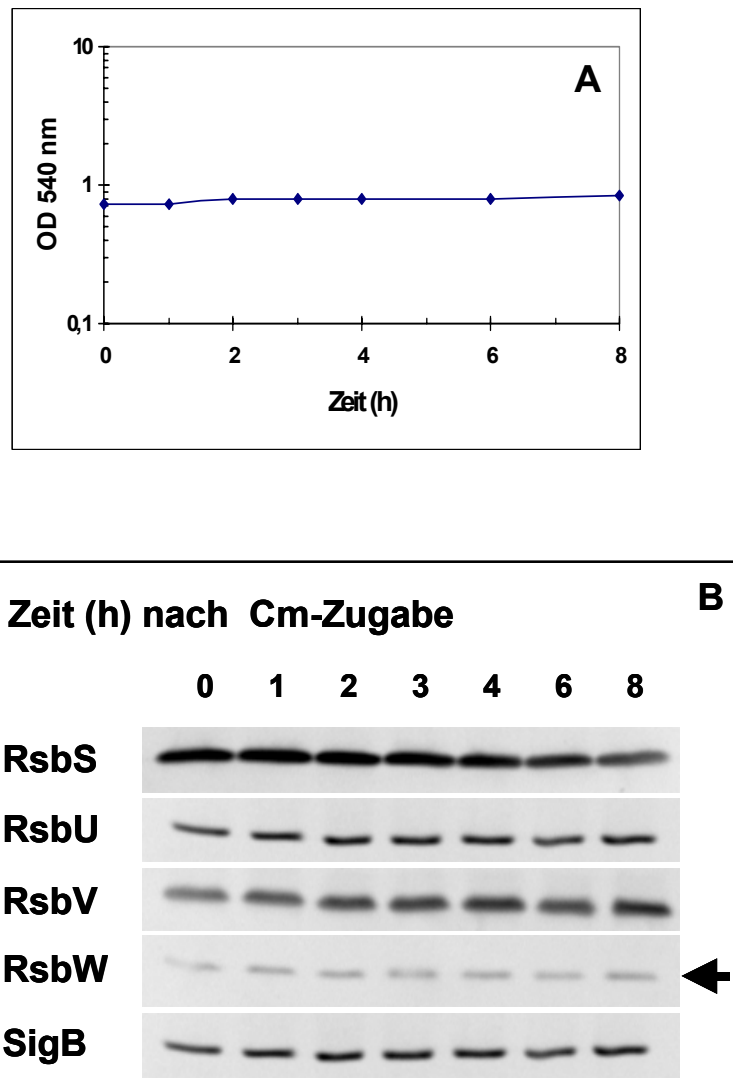
**Abb. 22 Western-Blot: Einfluss des Minimalmediums SMM auf das Basalniveau von SigB, RsbW und RsbV**

Um das Basalniveau der primären Regulatoren vergleichen zu können, wurden der WT (168) und die SigB<sup>-</sup>-Mutante (BSM29) bei 37°C jeweils in LB und in SMM gezogen. Die LB-Kultur wurde in der exponentiellen Phase bei OD<sub>540</sub>=0,5 geerntet. Bei der SMM-Kultur wurde die Proteinbiosynthese durch Zugabe von Cm mit einer Endkonzentration von 50 µg/µl gestoppt. Die Zugabe von Cm ist in der Beschriftung gekennzeichnet. Dieser Versuch wurde mit Stämme ohne *ctc::LacZ*-Fusion durchgeführt, da diese nicht Cm<sup>r</sup> sind. Es wurden alle 30 min Proben für den Western-Blot gezogen. In diesem Blot ist nur t<sub>180</sub> nach Cm-Gabe gezeigt, da kein Unterschied zu den anderen Proben bestand. Von den gewonnenen Zellextrakten wurden 60 µg-Aliquots im SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Western-Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen SigB, RsbW und RsbV geprobt.

#### 4.2.3. Sind SigB, RsbV und RsbW während des Wachstums in der Kälte stabil?

Entgegen aller bisher untersuchten SigB-aktivierenden Stressarten war nicht nur keine der bisher bekannten Phosphatasen, RsbU oder RsbP notwendig für die Anschaltung der SigB-abhängigen Kälteantwort, sondern auch ein Fehlen des Anti-Antisigmafaktors RsbV konnte eine Induktion nicht verhindern. In den bisher bekannten Studien ermöglichte nur ein intakter Anti-Antisigmafaktor die Aktivierung von SigB (Völker et al. 1995 b, Dufour & Haldenwang 1994, Yang et al. 1996). Interessanter Weise zeigen neuste Studien der SigF-Regulation,

dass der zu RsbW ähnliche Anti-Antisigmafaktor SpoIIAB nur dann Stabilität in der Zelle aufweist, wenn er im Komplex mit SigF oder SpoIIAA gebunden ist. Sobald SpoIIAB frei vorliegt, stellt es ein Substrat für die Proteolyse durch die ClpCP-Protease dar (Pan et al. 2001, Dworkin & Losick 2001).



**Abb. 23 Stabilität von SigB, RsbV und RsbW während des Wachstums bei 16°C**

Der *B. subtilis*-Wildtyp 168 wurde in SMM, wie in Material und Methoden beschrieben, kultiviert und zu 16°C umgesetzt. In der exponentiellen Phase der 16°C-Kultur wurde die Proteinbiosynthese mit 50 µg/µl Cm gestoppt. Bei 0, 1, 2, 4, 6 und 8 h wurden Proben für die Western-Blot-Analyse gezogen. Von den Rohextraktproben wurden 60 µg pro Spur in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, geblottet und mit monoklonalen Antikörpern detektiert. **A)** Wachstumsverlauf nach Cm-Zugabe **B)** Western-Blot.

Daher war es Ziel dieses Versuches zu klären, ob SigB, RsbV oder insbesondere das zu SpoIIAB ähnliche RsbW in der Kälte instabil sind. Zur Untersuchung der Stabilität wurde die Proteinbiosynthese einer 168-Wildtyp-Kultur durch Zugabe einer hohen Chloramphenicolkonzentration vollständig inhibiert. Wie Abb. 23 A zeigt, stoppte das

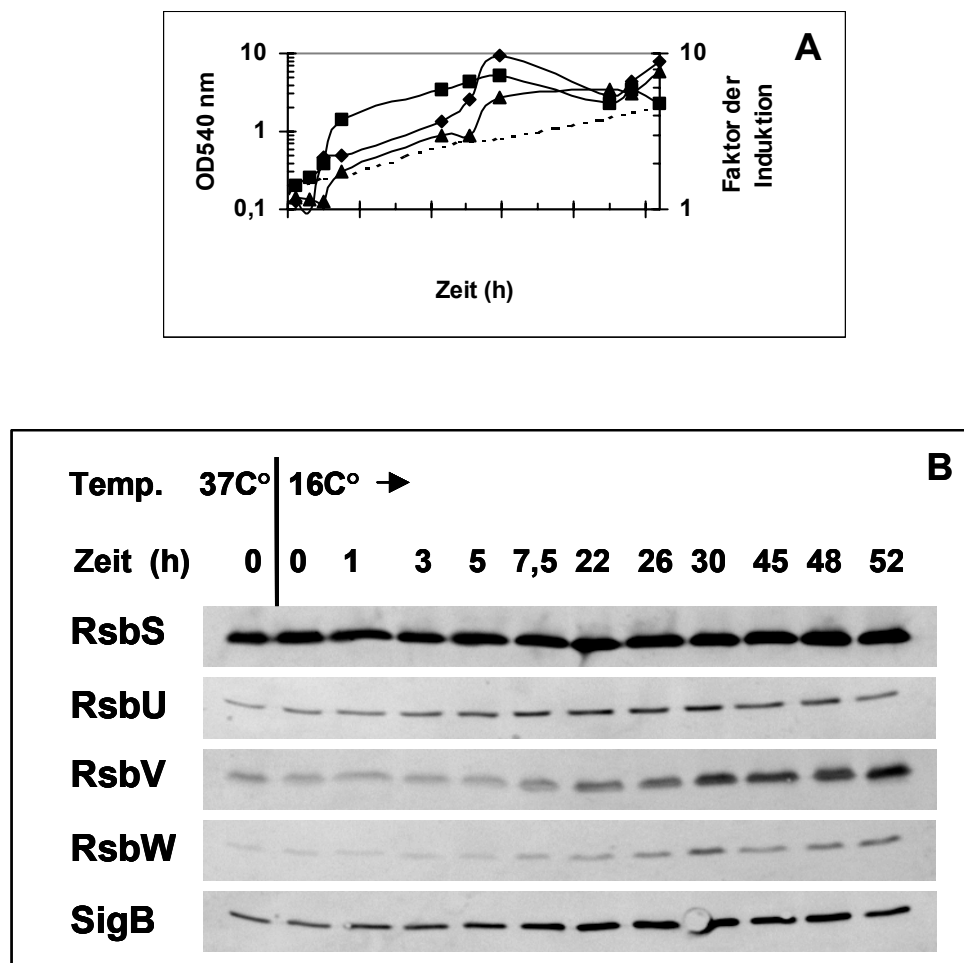
Wachstum sofort. Bei 0, 1, 2, 3, 4, 6 und 8 h wurden Proben für die Western-Blot-Analyse gezogen. Zum Nachweis, dass in jeder Spur die gleiche Proteinmenge aufgetragen worden ist, wurden die Blots zusätzlich mit Anti-RsbS und Anti-RsbU geprobt, deren Signalstärke während des Stresses nahezu unverändert bleibt.

Wie der Western-Blot (Abb. 23 B) zeigt, ließ sich die These, dass RsbW oder einer der anderen beiden Regulatoren instabil ist, nicht bestätigen. Die Inhibierung der Proteinbiosynthese hatte keinen Abbau der Proteine SigB, RsbW oder RsbV zur Folge. Abb. 18 B zeigt deutlich, dass die Bandenstärke auch acht Stunden nach Chloramphenicolgabe konstant geblieben war und sich die Proteine, entsprechend den bisher bekannten Bedingungen, als stabil erwiesen.



#### 4.2.4. SigB-, RsbV- und RsbW-Level während des Wachstums in der Kälte

Eine andere Möglichkeit der Regulation bestünde darin, dass die Mengen der einzelnen Proteine während des Wachstums ungleichmäßig ansteigen und in der Folge nicht genügend RsbW zur Inhibierung von SigB zur Verfügung steht. Um das zu überprüfen, wurden aus einer 16°C-Kultur während des Wachstums von 0-52 h Proben für einen Western-Blot entnommen. Die Quantifizierung (Abb. 24 A) des Blots (Abb. 24 B) ergab, dass die Menge der drei Proteine etwa zeitgleich um das Achtfache zunahm. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte eine ungleichmäßige Zunahme ausgeschlossen werden.

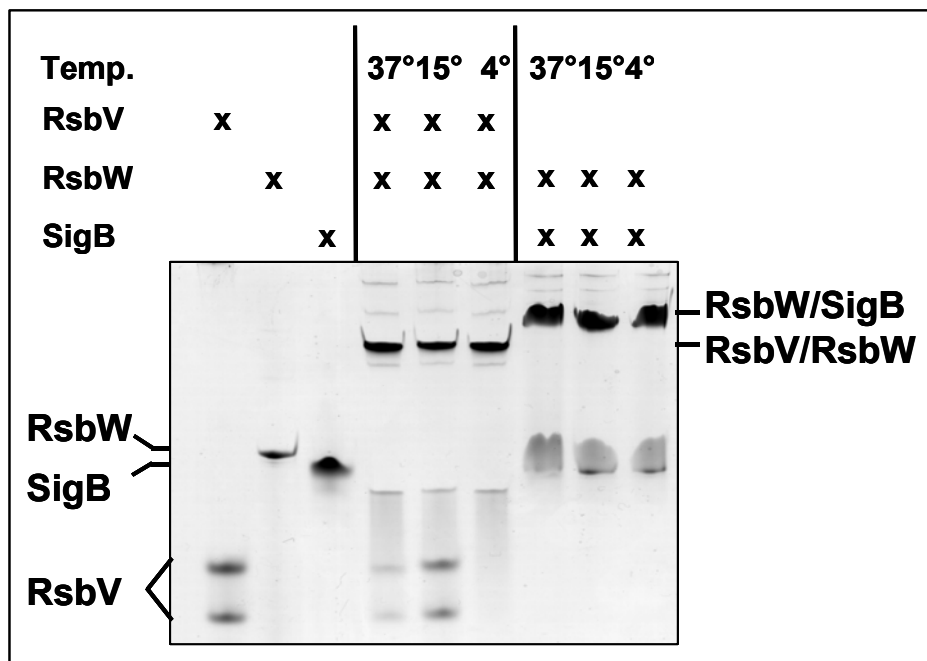


**Abb. 24 Akkumulation von SigB, RsbW und RsbV während des Wachstum in der Kälte**

Der *B. subtilis*-Wildtyp 168 wurde in SMM bei 37°C bis OD<sub>540</sub>=0,5 kultiviert, auf 0,1 verdünnt und zu 16°C umgesetzt. **A)** Gemeinsame Darstellung des Wachstumsverlaufes und der Quantifizierung. Die 16°C-Wachstumskinetik wurde mittels der gestrichelten Linie gekennzeichnet. Folgende Symbole repräsentieren die Quantifizierung der Proteine: ♦ SigB, ■ RsbW, und ▲ RsbV. **B)** (siehe nächste Seite) Unmittelbar vor dem Umsetzen und während des Wachstums bei 16°C wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben für den Western-Blot gezogen, so dass eine Kinetik (0-52 h) erhalten wurde. Zum Vergleich wurde zusätzlich eine 37°C-Probe aus der exponentiellen Phase aufgetragen. Es wurden 60 µg/Spur appliziert. Der Blot wurde entsprechend der Beschreibung in Material und Methoden detektiert.

#### 4.2.5. „In vitro“-Analyse der Komplexbildung in der Kälte

Um zu prüfen ob die Proteine SigB, RsbW und RsbV bei niedrigen Temperaturen überhaupt noch in der Lage sind miteinander Komplexe einzugehen, wurde die Komplexbildung mit den aus *E. coli* gereinigten Proteinen SigB, RsbW und RsbV bei niedrigen Temperaturen nachvollzogen. Dazu wurden die Proteine zunächst einzeln bei 15°C und bei 4°C inkubiert, um eine Äquilibration der Proteine an die jeweilige Temperatur zu erreichen. Anschließend wurde RsbW in verschiedenen Ansätzen mit SigB und RsbV zu gleichen Teilen gemischt. Je Ansatz wurde ein Aliquot für 30 min bei 4°C, 15°C und 37° inkubiert. Im Folgenden wurden die Reaktionsansätze in der nativen Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Verschiebung der Einzelproteine in einen Komplex, welcher, wie schon dargestellt, wegen der niedrigeren elektrophoretischen Mobilität gut zu identifizieren war (Abb. 25), zeigt sehr deutlich, dass die Bildung des RsbW/SigB- als auch des RsbV/RsbW-Komplexes sowohl bei niedrigen Temperaturen, sowie wie bei 37°C stattfinden kann.



**Abb. 25 Analyse der „in vitro“ Komplexbildung von SigB, RsbW und RsbV**

SigB, RsbW und RsbV wurden als *Strep*-tag-Fusionsproteine aus *E. coli* gereinigt. Für die Interaktionsstudien bei 4°C, 15°C und 37°C wurden die Proteine einzeln bei den drei Temperaturen vorinkubiert. Dann wurden äquimolare Mengen (0,5 nmol) von SigB und RsbW und genauso von RsbW und RsbV gemischt und für 30 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Gemische wurden im Nativgel ÜN mit 5 mA/Gel bei 4°C aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt.

#### 4.2.6. Analyse der Komplexe: Fraktionierung des Rohextraktes mittels Gelfiltration

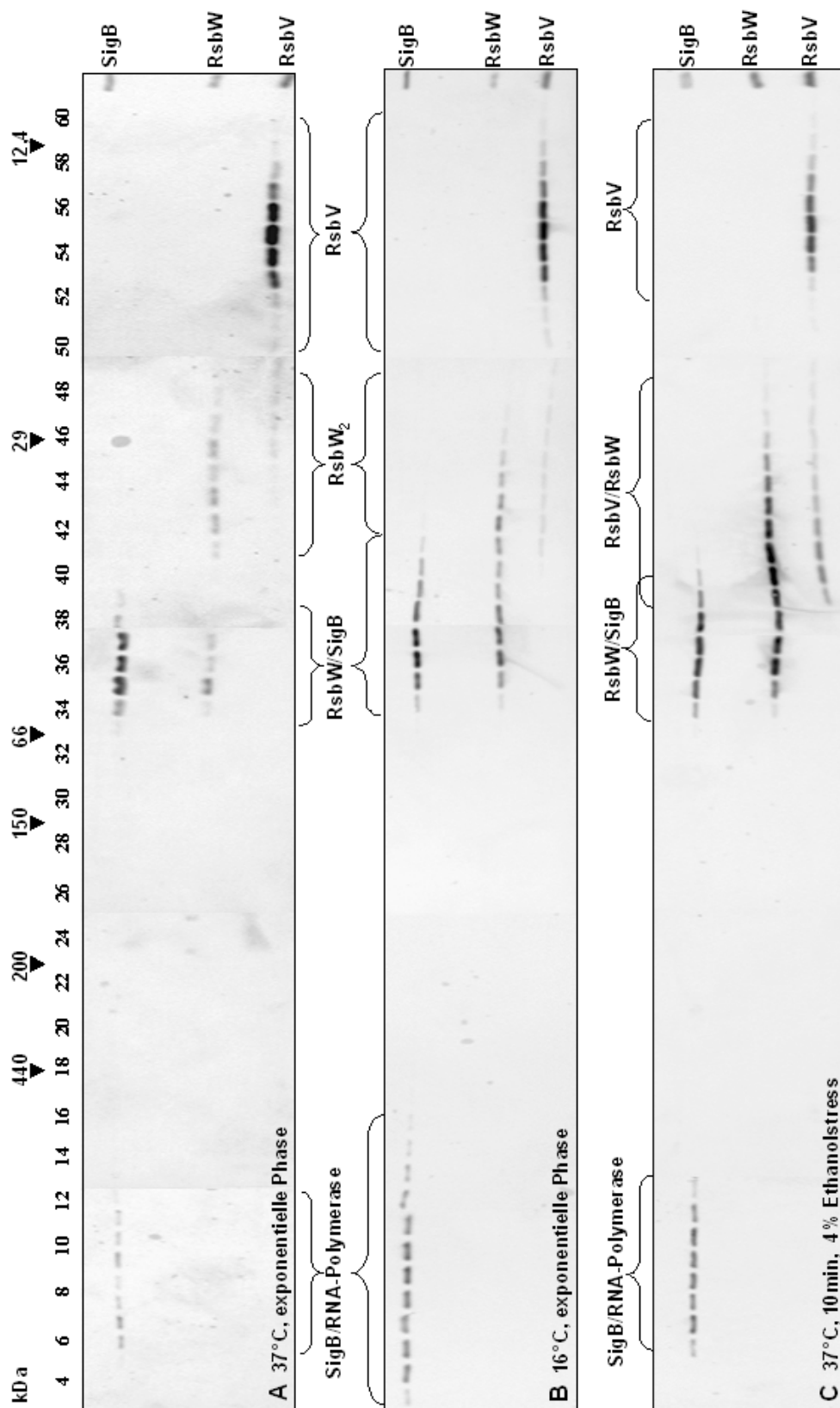
Sowohl aus den Western-Blots als auch aus den *ctc::LacZ*-Bestimmungen ging hervor, dass RsbV aus noch zu klärender Ursache keine Rolle für die Induktion des SigB-Regulons bei niedriger Temperatur spielte, da eine RsbV-Mutante die volle Stressanschaltung zeigte. In dem „in vitro“-Versuch konnte nachgewiesen werden, dass die Bildung eines RsbV/RsbW-Komplexes prinzipiell auch bei 16°C möglich war. Daher war es Ziel dieses Versuches, durch Auftrennung des Wildtyp-Rohextraktes (16°C, exponentielle Phase) über eine präparative Gelfiltrationssäule und Blotten von Aliquots der einzelnen Fraktionen zu untersuchen, ob RsbV während des Wachstums in der Kälte mit RsbW einen Komplex bildet, also gemeinsam mit RsbW eluiert oder größtenteils allein vorliegt, was eine Elution im Bereich von Cytochrom C (12,5 kDa) zur Folge hätte. Die Blots wurden mit Antikörpern gegen SigB, RsbW und RsbV detektiert. Bei der Auswertung der Gelfiltration wurde davon ausgegangen, dass Proteine, die in einer Fraktion zu finden waren, als RsbW/SigB- bzw. RsbV/RsbW-Komplexe vorlagen.

Die Trennleistung der eingesetzten Superdex 200-Gelfiltrationssäule war sehr gut, so dass RsbW/SigB- und RsbV/RsbW-Komplexe größtenteils in separaten Fraktionen eluierten. Um einen Überblick über die Verteilung der einzelnen Proteine und der Komplexe zu bekommen, wurden die Blots entsprechend der Fraktionsreihenfolge beginnend mit dem hochmolekularen Bereich hin zum niedermolekularen Bereich beladen (Abb. 26). Die Signalstärke ist nach 10 min Ethanolstress (C) und während des Wachstums bei 16°C (B) wegen der Induktion von SigB, RsbW und RsbV nach Stress entsprechend stärker als in der exponentiell wachsenden, ungestressten 37°C-Kultur (A). Die Aliquots wurden wie in Material und Methoden beschrieben aufgearbeitet. Um ein vollständiges Bild zu erhalten, wurden die Fraktionen des gesamten Trennbereichs beginnend bei etwa 100 ml bis einschließlich 300 ml aufgetragen, wobei Minigele mit jeweils 15 Spuren verwendet wurden. Im SDS-Gel werden die Komplexe, welche sich in den einzelnen Fraktionen befinden, denaturiert und die einzelnen Proteine sind daher in den Blots als einzelne Proteinbanden sichtbar.

**Abb. 26 Analyse der Komplexbildung zwischen SigB und den primären Regulatoren mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie (siehe folgende Seite)**

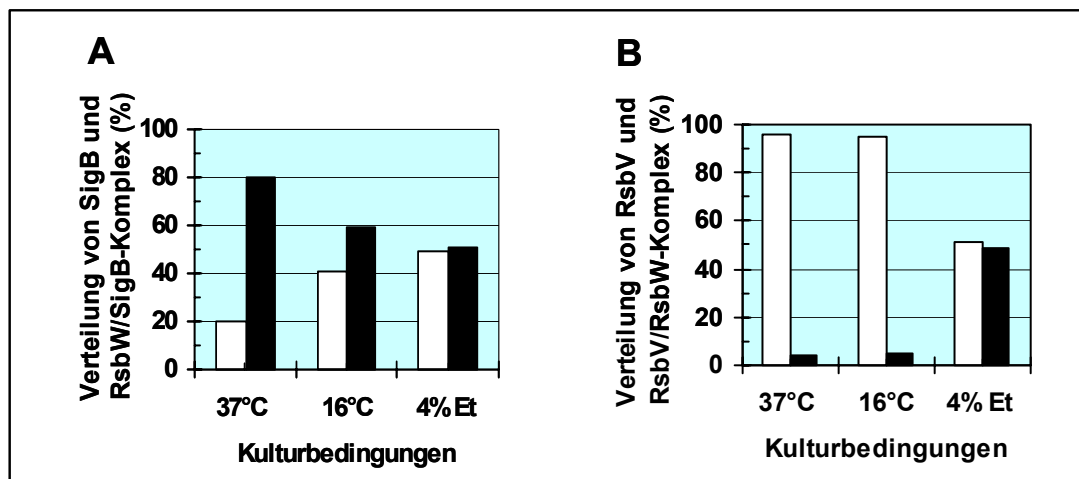
Kulturen des *B. subtilis*-Wildtyps 168 wurden **A)** bei 37°C **B)** bei 16°C in SMM bis OD<sub>540</sub>=1 gezogen und dann geerntet. **C)** Eine Kultur wurde in LB gezogen, in der exponentiellen Phase für 10 min mit 4% Ethanol gestresst und sofort geerntet. Nach einem Aufschluss durch Ultraschall folgte die Abtrennung der Zelltrümmer und Membranfraktionen (in Material und Methoden beschrieben) durch 10 min Zentrifugation bei 15000 rpm und einer Ultrazentrifugation für 45 min bei 35000 rpm. Der erhaltene Proteinrohextrakt wurde auf einer Gelfiltrationssäule Superdex 200 aufgetrennt. Die in dieser chromatographischen Auftrennung erhaltenen Fraktionen wurden einer SDS-PAGE und

Western-Blot-Analyse unterzogen. SigB, RsbW und RsbV wurden mit monoklonalen Antikörpern detektiert. Die Position der Proteine und der für die Eichung der Säule verwendeten Markerproteine sind angezeichnet.



Um einen Eindruck über den Anteil an frei bzw. im Komplex vorliegendem RsbV, RsbW und SigB zu bekommen, wurden die Blots (Abb. 26) einer semiquantitativen Pixelauswertung in „Image Quant“ unterworfen, deren Ergebnisse (Abb. 27 A und B) als Säulendiagramm dargestellt sind. Die 37°C-Kultur diente als Negativkontrolle, da sie das Verteilungsmuster der Proteine vor Stress zeigte. In der exponentiellen Phase-Kultur (37°C) lag ein Großteil von SigB (ca. 80%) erwartungsgemäß im Komplex mit RsbW vor (Abb. 27 A). Die übrigen 20% konnten im Ausschlussvolumen, wahrscheinlich in Assoziation mit der RNA-Polymerase gefunden werden. Entsprechend der vermuteten RsbW<sub>2</sub>:SigB<sub>1</sub>-Konformation eluierte der Komplex im Bereich von 60 Kilodalton. RsbV lag fast vollständig als Monomer vor und eluierte bei seinem Einzelmolekulargewicht von 13 Kilodalton im Bereich um Fraktion 54. In früheren Gelfiltrations- und IEF-Studien konnte nachgewiesen werden, dass RsbV in Abwesenheit eines SigB-induzierenden Stressses phosphoryliert ist (Völker et al. 1995 a, Völker et al. 1996). Nach Ethanolstress konnte ein Anteil von etwa 45% an SigB gefunden werden, welches „frei“ vorlag. „Freies“ SigB bedeutet im Rohextrakt, dass SigB nicht an RsbW gebunden war, sondern vermutlich mit der Core-RNA-Polymerase assoziiert vorlag. Daher war die SigB-Bande auch im sehr hochmolekularen Bereich über 440 kDa zu detektieren (Abb. 26 A-C). Bei Ethanolstress war RsbW ungefähr zur Hälfte jeweils an RsbV oder SigB gebunden. In Bezug auf RsbV (Abb. 27 B) zeigten der 16°C- und der 37°C-Extrakt ein ähnliches Bild: RsbV wurde in beiden Proben zu 95% als einzelnes Protein im 13 kDa Bereich gefunden. Ein großer Unterschied konnte in Bezug auf das Elutionsprofil von RsbV zwischen der mit Ethanol behandelten Kultur und dem 16°C-Extrakt gefunden werden. Nach Ethanolstress konnte etwa die Hälfte von RsbV an RsbW binden, so dass die Freisetzung des Sigmafaktors gewährleistet wurde. Im 16°C-Extrakt war praktisch kein RsbV (5%) in gemeinsamen Fraktionen mit RsbW zu finden.

Das Verteilungsmuster von RsbW korrelierte mit der Auswertung von RsbV. Es konnte gezeigt werden, dass im Kälteextrakt der größte Teil von RsbW im Komplex mit SigB vorliegt und nur ein geringer Anteil an RsbW zusammen mit RsbV detektiert wurde. Für den Log-Phase-Extrakt konnte genau das umgekehrte Verhältnis bestimmt werden, d.h. der größte Anteil an RsbW lag gemeinsam mit RsbV vor. In der ethanolgestressten Kultur lagen jeweils 1/3 RsbW mit RsbV, SigB und mit beiden in gemeinsamen Fraktionen vor.



**Abb. 27 Quantifizierung der Blots (Abb. 26) zur Analyse der RsbV-, RsbW- und SigB-Verteilung bei 16°C**

Die Blots (Abb. 26) wurden mit der Software „Image Quant“ quantifiziert. Das Säulendiagramm zeigt die Verteilung (%) der einzelnen und der im Komplex vorliegenden Proteine bei 37°C, 16°C und nach Ethanolstress.

**A)** ■ RsbW/SigB-Komplex, □ SigB (vermutlich an Core-RNA-Polymerase gebunden) **B)** ■ RsbV/RsbW-Komplex, □ RsbV einzeln

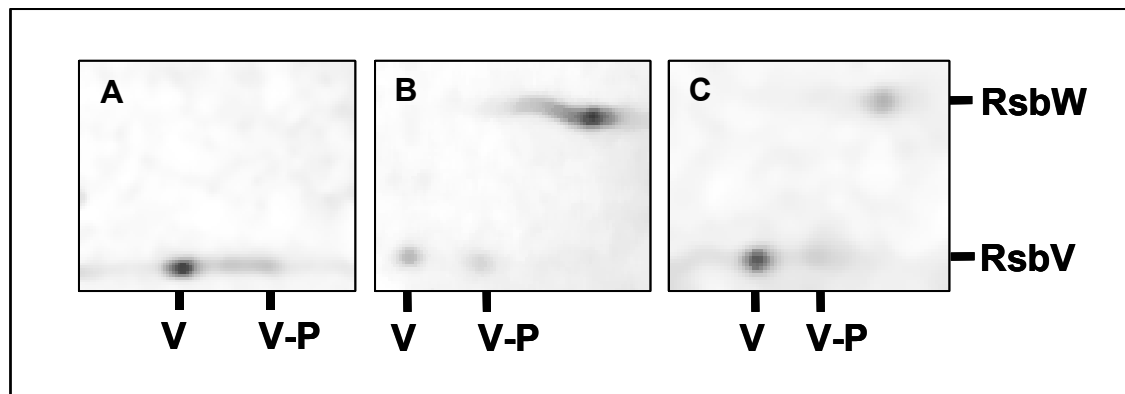
Die Ergebnisse der Gelfiltrationsstudien bestätigen die Western-Blot-Analysen und die LacZ-Bestimmung. RsbV ist aus noch zu klärenden Gründen bei Wachstum in der Kälte nicht in der Lage mit RsbW zu interagieren. Ferner scheint RsbV auch nicht durch ein anderes, unbekanntes Protein an der Interaktion mit RsbW gehindert zu werden, da es bei seinem sehr niedrigen Molekulargewicht von 13 kDA eluiert (Abb. 21). Diese Studien zeigen, dass praktisch kein RsbV/RsbW-Komplex „in vivo“ bei Kältestress existiert, wohl aber noch der RsbW/SigB-Komplex.

#### 4.2.7. Analyse des Phosphorylierungsstatus von RsbV mit Hilfe der Western-Blot-Analyse von zweidimensionalen Gelen

Die Gelfiltration hatte gezeigt, dass in der Kälte RsbV „in vivo“ fast ausschließlich allein und nicht im Komplex mit RsbW vorlag. Zumindest die heterolog exprimierten und gereinigten Proteine waren aber noch zur Komplexbildung befähigt wie Abb. 25 zeigt. Von nicht gebundenem RsbV in ethanolgestressten Zellen war bekannt, dass es am Serin58 phosphoryliert war. Daher war es nun interessant zu erfahren, ob einzelnes RsbV in der Kälte phosphoryliert oder dephosphoryliert vorliegt, da die beiden bekannten Phosphatasen

RsbU und RsbP für die Kälteanschaltung entsprechend der vorangegangenen Experimente nicht notwendig waren. Erfahrungsgemäß führte eine zusätzliche Phosphatgruppe bei RsbV in zweidimensionalen Gelen zu einer gut sichtbaren Verschiebung in den sauren Bereich.

Folgende Fraktionen wurden der Mini-2D-Gel-Analyse unterworfen und dann geblottet: Eine Fraktion, welche komplexiertes RsbV (F42) enthielt, eine Fraktion mit einzeln vorliegendem RsbV (F 54) und *B. subtilis*-WT-Rohextrakt. Der Blot wurde mit Anti-RsbV und mit Anti-RsbW geprobt. Dabei diente der RsbW-Spot der sicheren Zuordnung von saurer und basischer Seite. Es zeigte sich, dass RsbV im Rohextrakt und als einzelnes Protein (F 52) kaum phosphoryliert vorlag. Die geringen Mengen an RsbV, welche mit RsbW in einer Fraktion gemeinsam gefunden wurden, waren zum Teil phosphoryliert, was zeigt, dass RsbW bei 16°C zumindest teilweise noch zur Phosphorylierung befähigt ist.



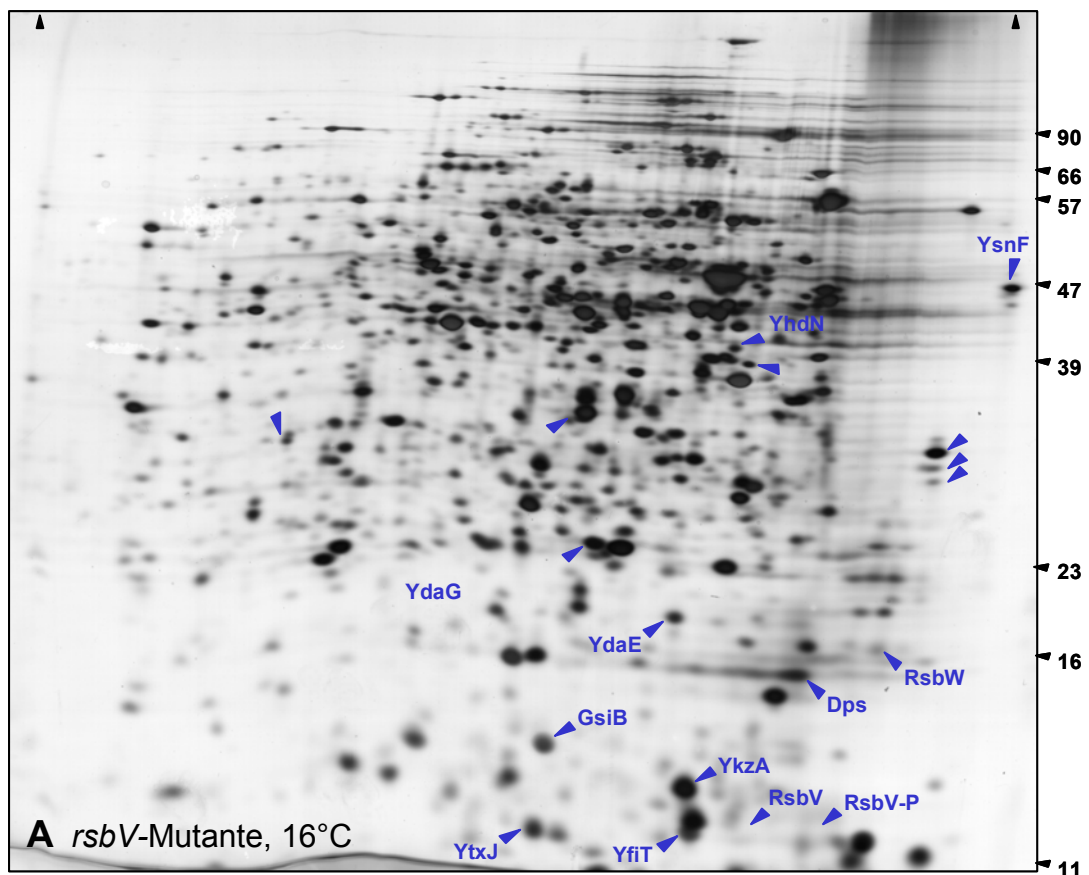
**Abb. 28 Analyse des Phosphorylierungsprofils von RsbV mit Hilfe von Mini-2D-Gelen**

Von den aus der Gelfiltration erhaltenen Fraktionen F 43 und F 54 des bei 16°C kultivierten *B. subtilis*-WT-Extraktes (168) wurden 300 µl mit 2 Vol Ethanol gefällt und in der 2D-Mini-Gelelektrophorese im Bereich von pH 4-7 aufgetrennt. Vom Rohextrakt wurden 30 µg aufgetrennt. Diese Form der Auftrennung ermöglicht die Unterscheidung von RsbV und RsbV-P. Die Minigele wurden nach dem Westernblotting auf Nitrocellulose mit Antikörpern gegen RsbW und RsbV detektiert. **A)** F 54, RsbV allein **B)** F 43, RsbV und RsbW in einer gemeinsamen Fraktion **C)** 16°C-Rohextrakt

#### 4.2.8. Nachweis der Induktion des Regulons in 2D-Gelen

Nachdem in der vorliegenden Arbeit im Western-Blot und durch LacZ-Bestimmung gezeigt werden konnte, dass bei Wachstum in der Kälte eine Induktion von SigB und seiner Regulatorproteine auch in einer RsbV-Mutante möglich ist, war es auch von enormen Interesse zu zeigen, dass das gesamte Regulon auch in der RsbV-Mutante angeschaltet ist. Die Kulturen wurden in SMM bei 16°C gezogen und in der exponentiellen Phase geerntet. Die Extrakte waren vor Verwendung für die zweidimensionale Gelanalyse durch Bestimmung der LacZ-Aktivität überprüft worden, wobei der Wildtyp 168 und die *rsbV*-Mutante (BSM156)

erwartungsgemäß hohe MU-Werte aufwiesen und die *sigB*-Mutante (BSM156) keine Induktion zeigte. Abb. 29 A zeigt zur Übersicht der Trennung ein mit Silbernitrat gefärbtes zweidimensionales Gel der *rsbV*-Mutante. Die ausgewählten Ausschnitte aus den Gelen (Abb. 29 B) zeigen in dieser Reihenfolge die Anschaltung von SigB und als Beispiel für die Induktion eines Regulators: RsbW. Die Induktion der generellen Stressproteine konnte im Wildtyp und in der *RsbV*-Mutante am Beispiel der bekannten SigB-abhängigen Proteine GsiB, YfkM und Dps gezeigt werden. Wie erwartet, zeigte die *SigB*<sup>-</sup>-Mutante keine Akkumulation SigB-abhängiger Proteine. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl im Wildtyp als auch in der *RsbV*-Mutante eine Akkumulation der generellen Stressproteine stattfindet. Erstaunlicher Weise war festzustellen, dass die Induktion der SigB-abhängigen Stressproteine in der *rsbV*-Mutante, auch bei mehrfacher Wiederholung der Gele, immer sehr viel stärker war als im Wildtyp. Diese Beobachtung wird deutlich in den in Abb. 29 gezeigten Ausschnitten dokumentiert. Die Induktion von Ctc, welches als Reportergen verwendet worden war, konnte mit Hilfe des 2D-Gels noch einmal auf Proteinebene bestätigt werden.

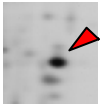
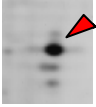

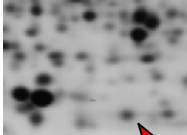
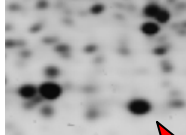
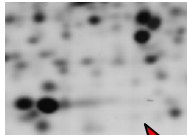
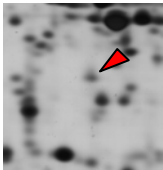
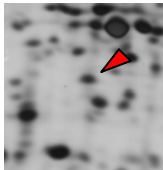
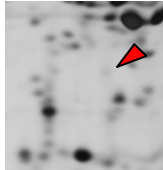
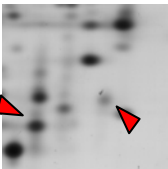
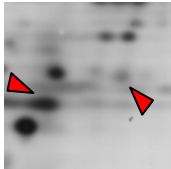
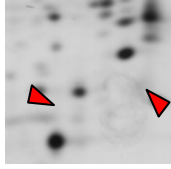
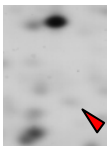

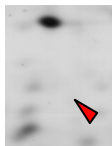


**Abb. 29 Induktion des SigB-Regulons bei Wachstum in der Kälte**

Die *B. subtilis*-Stämme BSM151 (WT), BSM155 (*rsbV*) und BSM156 (*sigB*) wurden bei 37°C bis zur exponentiellen Phase angezogen, dann auf OD<sub>540</sub>=0,1 verdünnt und bei 16°C weiter inkubiert. Zur Kultivierung wurde SMM verwendet. Die 16°C-Kulturen wurden in der exponentiellen Phase bei OD 1,5 geerntet. Zur Untersuchung der Aktivität des SigB-Regulons im 2D-Gel, wurden IPG-Streifen mit

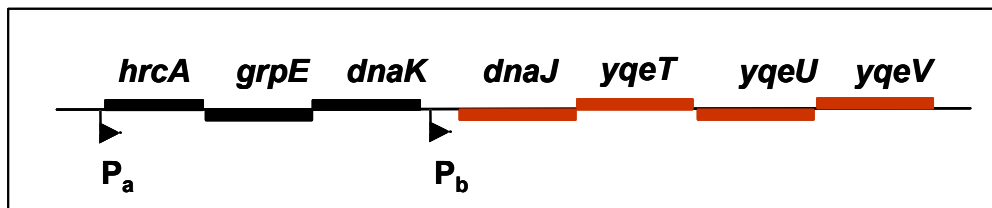


einem pH-Gradienten von 4-7 verwendet. Pro Gel (12,5%ig) wurden 100 µg Zellextrakt eingesetzt. Die 2D-Gele wurden mit Silbernitrat gefärbt und das Proteilmuster für die Auswertung eingescannt. **A)** 2D-Gel einer *rsbV*-Mutante (BSM155). Zur Übersicht wurde ein Teil der SigB-abhängigen Proteine mit Pfeilen markiert. **B)** Ausschnitte aus den Gelen des WT, der *sigB*-Mutante und *rsbV*-Mutante, die das Vorhandensein der Induktion und die Induktionsstärke dokumentieren.

<b>B</b>	<i>wt</i>	<i>rsbV</i>	<i>sigB</i>	
<b>Ctc</b>				
<b>YfkM</b>				
<b>SigB</b>				
<b>Dps</b>				<b>RsbW</b>
<b>GsiB</b>				

#### 4.2.9. Haben die im *dnaK*-Operon kodierten Proteine DnaJ, YqeT, YqeU und YqeV einen Einfluss auf die SigB-abhängige Kältereulation?

In Western-Blot-Analysen und durch die Aufnahme einer Wachstumskurve sollte der Einfluss von DnaJ, YqeT, YqeU und YqeV auf die SigB-abhängige Kältereulation getestet werden. Angeregt wurden diese Untersuchungen durch Studien von Haga et al. (2001), welche im Hefe-Zwei-Hybriden-System Interaktionen zwischen SigB und DnaJ nachweisen konnten.



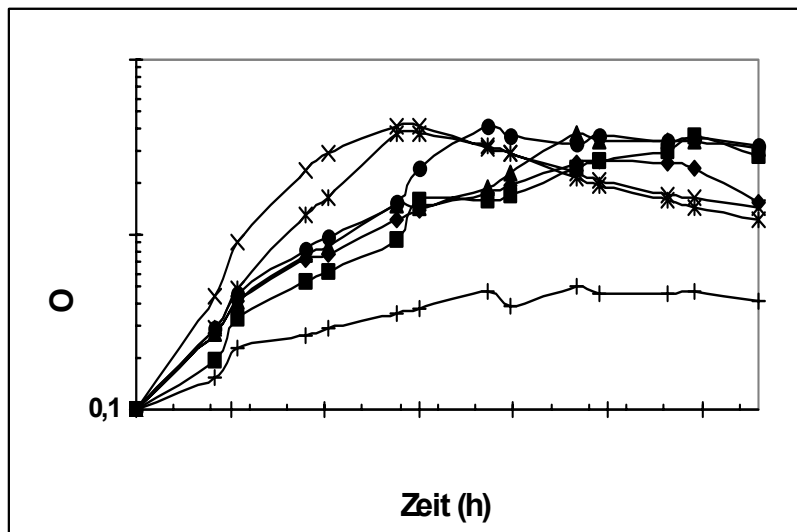
**Abb. 30 *dnaK*-Operon von *B. subtilis***

Das *dnaK*-Operon ist Bestandteil des CIRCE-Regulons (CIRCE=controlling inverted repeat of Chaperon expression). Die Produkte der zum *dnaK*-Operon (Abb. 30) gehörenden Gene *hrcA*, *grpE*, *dnaK* und *dnaJ* sind an der Klasse I-Hitzeshockantwort in *B. subtilis* beteiligt (Schulz & Schumann 1996) (Yuan & Wong 1995). Von Homuth et al. (1997) wurde das Operon mit Hilfe von Transkriptionsanalysen um drei Gene erweitert: *yqeT*, *yqeU* und *yqeV*. Diese neu gefundene Gene waren weder essentiell für das Wachstum bei hohen Temperaturen, noch in die Regulation der Sporulation involviert. In den hier durchgeführten Versuchen wurde geprüft, ob der Verlust von *dnaJ* oder eines der drei neuen Genen einen Einfluss auf die SigB-Regulation während des Wachstums bei 16°C hat, wofür uns die Einzelmутanten von Georg Homuth freundlicher Weise zur Verfügung gestellt wurden.

##### 4.2.9.1. Charakterisierung des Kältewachstums der Einzelmутanten

Chromosomale DNA der Einzelmутanten wurde in den schon für alle vorhergehenden Versuche verwendeten Wildtyp 168 transformiert. Ein identischer genetischer Hintergrund konnte in den resultierenden Stämmen auf diese Weise sichergestellt werden: BSM152 (*dnaJ*), BSM160 (*yqeU*), BSM161 (*yqeT*) und BSM162 (*yqeV*). Das Wachstum der Stämme wurde durch Aufnahme einer Wachstumskurve bei 16°C in SMM mit den parallel kultivierten Mutanten BSM151 (WT), BSM155 (*rsbV*), BSM156 (*sigB*) verglichen. Abb. 31 zeigt, dass der Verlust von DnaJ einen dramatischen Einfluss auf das Wachstum hat. Eine DnaJ-Mutante durchläuft nach dem Umsetzen von 37°C zu 16°C noch maximal drei Teilungen und stellt dann das Wachstum bei einer OD<sub>540nm</sub>=0,5 ein. Das Fehlen von YqeU, YqeV und YqeT

zeigte keinen Effekt auf das Wachstum. Diese Stämme wachsen im Gegenteil etwas schneller als der Wildtyp.



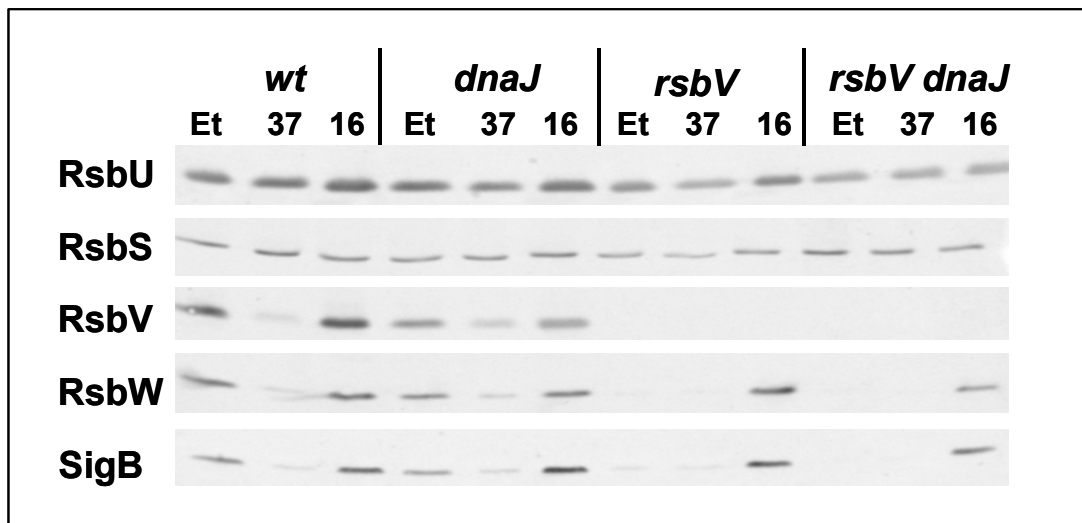
**Abb. 31 Einfluss von *dnaJ*-, *yqeT*-, *yqeU*- und *yqeV*-Mutanten auf das Kältewachstum**

Isogene des *B. subtilis*-Wildtyps 168 wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, bei 16°C in SMM kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Erstellung der Wachstumskurve von folgenden Stämmen entnommen: ■ BSM151 (WT), ◆ BSM156 (*sigB*), ▲ BSM155 (*rsbV*), + BSM152 (*dnaJ*), \* BSM160 (*yqeU*), × BSM161 (*yqeT*) und • BSM162 (*yqeV*).

#### 4.2.9.2. Einfluss einer DnaJ-Mutante auf die SigB-abhängige Kältereulation

Bei 16°C konnte in der *dnaJ*-Mutante ein Wachstumsstopp bei einer OD<sub>540nm</sub> von 0,5 festgestellt werden. Im Western-Blot sollte geprüft werden, ob das Fehlen von DnaJ einen Einfluss auf die Induktion des SigB-Regulons bei niedriger Temperatur hat. Der Wildtyp (BSM151), BSM155 (*rsbV*), BSM159 (*dnaJ*) und BSM163, eine *rsbV/dnaJ*-Doppelmutante, wurden, entsprechend der Beschreibung in Material und Methoden, kultiviert. Falls DnaJ einen Einfluss auf die SigB-Regulation hat, indem es entweder an SigB oder RsbW bindet und auf diese Weise eine Interaktion zwischen Sigmafaktor und Antisigmafaktor verhindert, sollten SigB, RsbW und RsbV im 16°C-Extrakt nicht induziert sein. Die Doppelmutante diente zur Überprüfung, ob RsbV einen zusätzlichen Einfluss besitzt. Zur Beurteilung der Induktionsstärke wurde wie in Abb. 18 für jeden Stamm ein mit 4% Ethanol behandelter Extrakt und eine 37°C-Probe als Kontrollen mit aufgetragen. Wie in Abb. 32 zu sehen, war in der DnaJ-Mutante die Stressanschaltung nach Ethanol und bei Wachstum in der Kälte noch möglich. Die *rsbV/dnaJ*-Doppelmutante, leicht identifizierbar durch das fehlende RsbV-Signal und der nicht mehr vorhandenen Induktion nach Ethanolstress, war bei 16°C ebenfalls voll induziert. Es musste festgestellt werden, dass der bei der *dnaJ*-Mutante gefundene

Phänotyp während des 16°C-Wachstums keinen Einfluss auf die SigB-abhängige Induktion des SigB-Regulons hat.



**Abb. 32 Analyse der *dnaJ*-Mutante im Western-Blot**

Die Kulturen der *B. subtilis*-Stämme BSM151 (WT), BSM155 (*rsbV*), BSM152 (*dnaJ*) und die Doppelmutante BSM163 (*dnaJ/rsbV*) wurden bei 37°C kultiviert und nach dem Umsetzen zu 16°C in der exponentiellen Phase geerntet. Eine weitere Kultur wurde jeweils mit 4% Ethanol behandelt und nach einer Stunde geerntet. Für die Analyse im SDS-Page wurden 60 µg/µl Probe aufgetragen. Nach dem Western-Blot wurden monoklonale Antikörper zur Detektion verwendet.

## 5 Diskussion

### 5.1. Charakterisierung der Protein-Protein-Wechselwirkungen von RsbV, RsbW und SigB

Für die Durchführung biochemischer Experimente wie Bindungsstudien, quantitative Western-Blots und die Analyse von Komplex-Stöchiometrien, sollten die einzelnen Proteine SigB, RsbW und RsbV nativ und in einem möglichst hohen Reinheitsgrad vorliegen. Nachdem die in der Diplomarbeit verwendete Reinigungsstrategie unter Nutzung des pMal-Systems nicht zu den gewünschten Ergebnissen geführt hatte, erwies sich das *Strep*-tag-System als sehr gut geeignet zur Reinigung der Proteine SigB, RsbW und RsbV. Die Proteine wurden als Fusion mit einem C-terminalen *Strep*-tag in *E. coli* exprimiert, welcher eine Affinitätschromatographie über eine StrepTactin-Säule erlaubte. Der gewünschte Reinigungsgrad von >95% konnte in zwei Reinigungsschritten über eine StrepTactin-Säule und einen Anionenaustauscher unter nativen Bedingungen erreicht werden. Für die Reinigung von SigB und RsbW (Abb. 6) wurde nach der Affinitätschromatographie eine Resource Q-Säule eingesetzt. Die Reinigung von RsbV (Abb. 7) gelang durch Verwendung einer Q-Sepharose-Säule und der nachfolgenden StrepTactin-Säule.

MALDI-TOF-Analysen bestätigten, dass die experimentell bestimmten Massen der gereinigten, löslich vorliegenden Fusionsproteine SigB, RsbW mit der theoretisch erwarteten Masse von SigB und RsbW fast identisch waren und RsbV mit einer Abweichung von 4,8 kDa ebenfalls gut korrelierte (Tab. 64).

Um phosphoryliertes RsbV (RsbV-P) „in vitro“ zu erstellen, konnte die Kinaseaktivität des zuvor gereinigten RsbW-Proteins ausgenutzt werden. Mittels einer Q-Sepharose-Säule gelang es, RsbV-P in einem Reinigungsschritt von der Kinase RsbW abzutrennen und >95% zu reinigen. Im Nativgel (Abb. 8) führte die zusätzliche Phosphatgruppe zu einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität von RsbV-P gegenüber RsbV. Die klar zu identifizierende Trennung von RsbV und RsbV-P ermöglichte den Nachweis, dass das gereinigte RsbV-P vollständig phosphoryliert war.

In Bindungsstudien im Nativgel war die Bildung der SigB/RsbW- und RsbW/RsbV-Komplexe zu beobachten, was belegte, dass die gereinigten Proteine trotz Modifikation durch den *Strep*-tag die zu erwartenden Bindungseigenschaften besaßen. Außerdem konnte mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese gezeigt werden, dass phosphoryliertes RsbV (RsbV-P) durch die Phosphatgruppe vollständig inaktiviert wird und somit nicht mehr in der Lage war, einen

RsbV/RsbW-Komplex zu bilden. RsbV und RsbV-P hatten die Eigenschaft im Nativgel in jeweils zwei Banden zu laufen. MALDI-TOF-Spektren dieser aus dem Gel ausgeschnittenen Banden bestätigten die Annahme, dass die jeweiligen beiden Banden RsbV bzw. RsbV-P darstellen (Abb. 8). Es handelt sich vermutlich um jeweils unterschiedliche Konformationen, welche die Aktivität von RsbV nicht beeinträchtigen, da nach RsbW-Zugabe beide Proteinbanden in eine RsbV/RsbW-Komplexbande verschoben wurden (Abb. 10).

Erste Hinweise auf genetischer Ebene deuteten darauf hin, dass die Aktivität von SigB durch das Regulatorprotein RsbW gesteuert wird (Benson & Haldenwang 1992, Boylan et al. 1993). Durch Coimmunpräzipitation von RsbW und SigB aus *B. subtilis*-Rohextrakt gelang Benson und Haldenwang (1993) der biochemische Nachweis für eine Antisigmafaktor-Funktion von RsbW. In Transkriptionsexperimenten, in denen partiell gereinigtes SigB und Core-RNA-Polymerase zusammen mit RsbW inkubiert wurden, war die Transkription in Anwesenheit von RsbW unterbunden (Benson & Haldenwang 1993). Dufour und Haldenwang (1994) zeigten durch die Fraktionierung von *B. subtilis*-Rohextrakten mittels Gelfiltration und Analyse dieser Fraktionen im SDS-Gel mit anschließendem Western-Blot, dass SigB in zwei separaten Peaks detektiert wurde. Im ersten Peak wurde SigB zusammen mit der RNA-Polymerase und im zweiten gemeinsam mit RsbW gefunden. Wie in der Einleitung eingehend beschrieben, wurden diese und die folgenden Analysen von SigB, RsbW und RsbV durch das sehr ähnlich regulierte sporulationsspezifische SigF-System stark beeinflusst. Als besonders bedeutsam erwies sich das Ergebnis, dass SpoIIAB neben seiner Fähigkeit den Antisigmafaktor zu binden, auch eine Kinasefunktion für den Anti-Antisigmafaktor SpoIIAA besitzt (Min et al. 1993). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde auch bei RsbW nach einer Kinasefunktion gesucht. In der IEF konnte nachgewiesen werden, dass RsbV durch RsbW phosphoryliert wird und RsbV-P nicht mehr in der Lage ist, RsbW zu binden (Dufour und Haldenwang 1994). Neben dem bekannten RsbW/SigB-Komplex wurde im Rahmen der oben beschriebenen Gelfiltrationsstudien von Dufour und Haldenwang (1994) der RsbV/RsbW-Komplex entdeckt.

Für den für diese Arbeit notwendigen Nachweis der Bindungsaktivität und die in der Folge beabsichtigten Komplexbildungsstudien mit den Proteinen SigB, RsbW und RsbV im Nativgel, war die Etablierung der nativen Gelelektrophorese erforderlich. Im Rahmen der folgenden Untersuchungen wurden spezifische Gemische der gereinigten Proteine miteinander inkubiert. Diese Ansätze wurden durch Anlegen einer geringen Spannung (5 mA/Gel) bei 4°C in einem Acrylamidgel ohne SDS aufgetrennt, um die gebildeten Komplexe während des Gellaufs zu erhalten. Die Auftrennung einzelner Proteine und ihrer Komplexe wurde schon erfolgreich zur Analyse der SigF-Regulation eingesetzt (Barilla et al. 1999,

Diederich et al. 1994, Lee et al. 2000, Lord et al. 1996). Die Gele (Abb. 10 und 11) wurden mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, was eine schnelle und unkomplizierte Auswertung ermöglichte. Die Banden der RsbW/SigB- und RsbV/RsbW-Komplexe waren sehr gut von den Banden der einzeln vorliegenden Proteine zu unterscheiden, da die Komplexbildung zu einer deutlich geringeren elektrophoretischen Mobilität führte. Als wesentlich schwieriger erwies sich die Unterscheidung von SigB und RsbW, da beide ein sehr ähnliches Laufverhalten im Gel zeigten. Ein Unterschied war nur anhand der Morphologie der Banden auszumachen, da RsbW als distinkte Bande vorlag und SigB eine stärker oval geformte Bande zeigte (Abb. 10 und 11).

Mit Hilfe der nativen Elektrophorese konnten für SigB, RsbW und RsbV die oben beschriebenen Interaktionen nachvollzogen werden. Bei Mischung von SigB und RsbW wurde der RsbW/SigB-Komplex gebildet (Abb. 10). Die Anwesenheit von ADP, ATP oder bereits phosphoryliertem RsbV (RsbV-P) hatte keinen Einfluss auf den Komplex. ATP bzw. ADP werden für die Komplexbildung von RsbW/SigB im Gegensatz zum SpoIIAB/SigF-Komplex nicht benötigt. Dieses Ergebnis stimmt mit Daten von Alper et al. (1996) überein. Bei alleiniger Inkubation von RsbW und RsbV war in jedem Fall eine RsbV/RsbW-Bindung zu beobachten. In Anwesenheit von ATP phosphorylierte RsbW den Anti-Antisigmafaktor RsbV, wodurch RsbV aus dem RsbV/RsbW-Komplex gelöst wurde. Wurden SigB, RsbW und RsbV zusammengegeben (Abb. 11), interagierte ein Teil von RsbW mit RsbV und der übrige Anteil mit SigB. Wurden die drei Proteine gemeinsam mit ATP inkubiert war, wie erwartet, überhaupt kein RsbV/RsbW-Komplex zu beobachten, da RsbV vollständig phosphoryliert wurde.

Zur Bestimmung der Stöchiometrie der RsbV/RsbW- und RsbW/SigB-Komplexe wurde die native Gelelektrophorese gleichermaßen eingesetzt. Durch Variation der zugegebenen Menge eines Partners, bei konstanter Menge des anderen Partners, konnte eine Titrationsreihe erstellt werden. Für den Komplex RsbV/RsbW ergab sich ein Verhältnis von 2:1. Wurde RsbW variiert, genügte die halbe Menge an RsbW um RsbV vollständig im Komplex zu binden (Abb. 12 A). Umgekehrt wurde die 1,5fache Menge an RsbV benötigt (Abb. 12 B), um RsbW zu komplexieren, was beinahe einem 2:1-Verhältnis entspricht. Insgesamt wiesen die Untersuchungen auf eine  $\text{RsbV}_2\text{:RsbW}_1$ -Stöchiometrie hin.

Gegenwärtig ergeben verschiedene Aussagen zur Stöchiometrie ein sehr heterogenes Bild, was sicherlich in der Variabilität der verschiedenen experimentellen Ansätze begründet liegt. Komplexbildung von gereinigtem RsbW mit RsbV und anschließendes „Cross-Linking“, gefolgt von der Auftrennung der gebildeten Komplexe im SDS-PAGE, ermöglichten Alper et

al. (1996) einen Rückschluss von der im Gel bestimmten molekularen Masse auf die Stöchiometrie der Komplexe. Das chemische Verbinden („Cross-Linking“) der Proteine über Lysinreste verhinderte einen Zerfall der Komplexe im Gel. Die radioaktive Markierung eines Partners erlaubte die Detektion. In den „Cross-Linking“-Experimenten wurden sowohl der von uns ebenfalls experimentell bestimmte RsbV<sub>2</sub>:RsbW<sub>1</sub>, aber auch RsbV<sub>1</sub>:RsbW<sub>2</sub> und RsbV<sub>1</sub>:RsbW<sub>1</sub>-Komplexe detektiert. Von den Autoren war selbst angemerkt worden, dass die auf diese Weise erworbenen Daten unsicher sind, da die chemische Modifikation von Proteinen häufig ein ungewöhnliches Laufverhalten im SDS-PAGE zur Folge hat. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse untermauern die These, dass es sich bei verschiedenen Komplexen (Alper et al. 1996) teilweise um ein durch das „Cross-Linking“ verursachtes modifiziertes Laufverhalten oder um Teilprodukte (RsbV<sub>1</sub>:RsbW<sub>1</sub>) handelt, da in der nativen Elektrophorese nur eine einzige RsbV<sub>2</sub>:RsbW<sub>1</sub>-Komplexbande gefunden wurde (Abb. 10, 11, 12 A). Dufour und Haldenwang (1994) kamen durch die Fraktionierung von *B. subtilis*-Rohextrakt und die Analyse der Fraktionen im Western-Blot zu dem Ergebnis, dass es sich um einen Heterotetramer-Komplex (2:2) handelt. Hingegen nehmen Delumeau und Yudkin (unveröffentlichte Daten) aufgrund von „Surface Plasmon Resonance“-Studien mit gereinigten Proteinen an, dass es sich um einen Heterodimer-Komplex (1:1) handelt. Hier durchgeführte Gelfiltrationsstudien mit *B. subtilis*-Rohextrakt, sowie die Ergebnisse von Dufour und Haldenwang (1994) sprechen gegen einen RsbV<sub>1</sub>:RsbW<sub>1</sub>-Komplex, weil die mit Antikörpern detektierten RsbV/RsbW-Komplexe deutlich früher eluierten, als das ebenfalls nachgewiesene RsbW-Dimer (etwa 30 kDa) (Abb. 26). Die Analyse der Gelfiltration des *B. subtilis*-Rohextraktes (Abb. 26) erlaubt einen direkten Rückschluss auf die RsbV/RsbW-Stöchiometrie, da es keinen Hinweis darauf gibt, dass noch weitere Proteine an diesen Komplex binden. Ein Heterotetramer würde eine molekulare Masse von etwa 100 kDa aufweisen, was der in dieser Arbeit gefundenen Elution des RsbV/RsbW-Komplexes bei <66 kDa widerspricht. Schlussfolgernd sprechen Gelfiltrations- und Titrationsexperimente für eine RsbV<sub>2</sub>:RsbW<sub>1</sub>-Stöchiometrie des Komplexes.

Die Analyse der RsbW/SigB-Stöchiometrie erwies sich als schwieriger, da beide Proteine einzeln im Nativgel eine ähnliche elektrophoretische Mobilität aufwiesen und eine vollständige Verschiebung beider Proteine in einen Komplex nicht gelang. Bei Variation der RsbW-Menge (Abb. 13) wurde die Verschiebung einer maximalen Menge an SigB bei einem zweifachen Überschuss an RsbW erreicht. Wurde SigB mit der vierfachen Menge an RsbW inkubiert, konnte unterhalb des ersten Komplexes ein Zweiter beobachtet werden, von dem auf Grund der etwas höheren elektrophoretischen Mobilität angenommen wurde, dass es sich um einen RsbW<sub>1</sub>:SigB<sub>1</sub>-Komplex handelt. Die umgekehrte Titrationsreihe erlaubte auf Grund mehrerer gebildeter Komplexe leider keine eindeutigen Rückschlüsse. Eine



weiterführende Analyse der RsbW/SigB-Komplexstöchiometrie konnte durch spektroskopische Messungen der Tryptophanfluoreszenz am Fluoreszenz-Spektrophotometer vorgenommen werden. In Titrationsexperimenten wurden entweder RsbW oder SigB zu dem jeweils anderen, in der Küvette vorliegenden Partner schrittweise einpipettiert. Die Komplexbildung führte im Vergleich zu den Einzelkomponenten zu einer geringeren Fluoreszenz. Die durch Integration der Fluoreszenzspektren erhaltenen Daten (Abb. 14) weisen ebenfalls auf einen  $\text{RsbW}_2\text{:SigB}_1$ -Komplex hin. Die Werte erlauben in ihrer jetzigen Form noch keine Bestimmung einer Dissoziationskonstante, aber die Form der Kurve unterstützt die Annahme, dass es sich um eine schnelle Assoziation von RsbW/SigB zu einem Komplex handelt und dieser sehr stabil ist. Hätte die Kurve eine flachere Form, so würde das auf einen instabileren Komplex hindeuten.

Unterstützt werden diese Ergebnisse von Transkriptionsassays (Alper et al. 1996), in denen gezeigt werden konnte, dass SigB nach Zugabe eines zweifachen Überschusses an RsbW nicht mehr in der Lage war, die RNA-Polymerase zu aktivieren, was zu einem Abbruch der Transkription führte. „Cross-Linking“-Experimente in derselben Veröffentlichung und Gelfiltrationsstudien von *B. subtilis*-Rohextrakt (Dufour & Haldenwang 1994) kamen hingegen zu dem Schluss, dass es sich um einen Heterotetramer (2:2)-Komplex handelt. Aus den Untersuchungen wurde geschlossen, dass es sich bei RsbW/SigB-Komplexen vornehmlich um  $\text{RsbW}_2\text{:SigB}_1$  handelt, prinzipiell aber auch eine 1:1-Stöchiometrie möglich ist.

Ein 2:1 Komplex wurde auch von Campell und Darst (2000) in detaillierten biochemischen Analysen für den SpoIIAB/SigF-Komplex bestimmt. „Surface-Plasmon-Resonance“-Daten gaben für den RsbW/SigB-Komplex relative Affinitäten von 93 nM und für RsbV/RsbW 62 nM an (Delumeau und Yudkin, unveröffentlichte Daten). Die relativ ähnliche Affinität von RsbW zu beiden Partnern stimmt gut mit den hier dargestellten Nativgelstudien überein, die darauf hinweisen, dass in Anwesenheit beider Partner (Abb. 11) RsbW auch beide Komplexe gleichermaßen eingeht. Die geringfügig höhere Affinität zu SigB konnte ebenfalls im Nativgel bestätigt werden, da RsbW auch bei einem Überschuss an RsbV mit unveränderter Intensität an SigB gebunden hatte. Eine zu unseren Daten genau entgegengesetzte Stöchiometrie wurde in „Surface-Plasmon-Resonance“-Untersuchungen bestimmt:  $\text{RsbW}_1\text{:SigB}_2$  (Delumeau und Yudkin, unveröffentlichte Daten). Insgesamt divergieren die Aussagen der einzelnen Autoren stark in Abhängigkeit von der verwendeten Methode, welche entweder auf der Beurteilung der molekularen Masse (Gelfiltrationsanalysen, „Cross-Linking“-Studien) oder auf funktionellen Studien wie Bindungsstudien oder einem Transkriptionsassay beruhte.

Gelfiltrationsstudien von aus *E. coli* gereinigten Proteinen (Abb. 9), sowie auch von *B. subtilis*-Rohextrakten (Abb. 26) zeigten, dass es sich bei nicht in Komplexen vorliegendem SigB und RsbV um Monomere mit den molekularen Massen 30 kDa (SigB) und 13 kDa (RsbV) handelt. Hingegen konnte für einzeln vorliegendes RsbW (Abb. 9 und Abb. 26) eine Homodimerform bestimmt werden. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Dufour und Haldenwang (1994) und Alper et al. (1996).

Für das SigF-System konnten die „in vivo“-Mengen des Antisigmafaktors SpoIIAB und der korrespondierenden Phosphatase SpoIIIE unter Nutzung der quantitativen Immunoblot-Analyse (Lucet et al. 1999) bestimmt werden. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass die Menge an SpoIIAB zu Beginn der Sporulation zwar etwas schneller zunimmt, aber beide Proteine zeitgleich ihr Induktionsmaximum erreichen und die Mengen beider Proteine an diesem Punkt fast identisch sind (Lucet et al. 1999). Neuste Erkenntnisse von Dworkin und Losick (2001) zeigen eine sporenspezifische Aktivierung des Sigmafaktors SigF, weil in der Spore einzeln vorliegendes SpoIIAB instabil ist (Dworkin & Losick 2001). Es wird durch die ClpCP-Protease abgebaut. Gleichzeitig fehlt eine entsprechende Neusynthese von SpoIIAB, da das Gen *spoIIAB* in einem Bereich der chromosomalen DNA lokalisiert ist, welcher bei der Teilung von Spore und Mutterzelle zuletzt in die Spore transferiert wird (Dworkin & Losick 2001, Pan et al. 2001).

Mit Sicherheit spielen für die Regulation der SigB-Aktivität auch die vor Stresseinwirkung in der Zelle vorliegenden Konzentrationsverhältnisse der Proteine zueinander eine entscheidende Rolle. Deshalb sollten die intrazellulären Konzentrationen der Proteine RsbV, RsbW und SigB durch quantitative „Western-Blot-Analyse“ bestimmt werden. Zur Durchführung der quantitativen Western-Blot-Analyse wurden die gereinigten, mit einem *Strep*-tag versehenen Proteine als Eichproteine eingesetzt. Die gemeinsame Analyse des Rohextraktes mit den gereinigten Proteinen auf einem Western-Blot sollte eine Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt erlauben. Für jede Stressbedingung wurden mindestens zwei unabhängig gezogene Kulturen getestet. Ein Problem stellte das Erreichen von linearen Eichreihen dar, da das in äußerst geringer Menge vorliegende Eichprotein während des Verdünnens an die Wand des Eppendorfcups adsorbierte (Abb. 15 A). Eine Verbesserung der Eichreihenqualität konnte durch die Verwendung von silanisierten PCR-Cups und Spitzen erreicht werden, welche die Adsorption von Protein verminderten. Am Ende der Promotionszeit gelang es, durch Kombination von silanisierten Cups und die direkte Aufnahme, sowie Verdünnung des Eichproteins in SDS-Pobenpuffer, welcher zuvor mit Bovine Serum Albumin (BSA) als Carrierprotein versetzt wurde, lineare Eichreihen zu erhalten (Abb.15 B). Entsprechend wurde der Versuch unternommen, die Rohextraktproben

anhand dieser Vorgehensweise erneut zu vermessen, was sich aber als nicht erfolgreich erwies, da ein Teil der ursprünglich vorhandenen Proteinmenge mittlerweile durch Abbau verloren gegangen war (Abb. 16). Im Rahmen der Promotion war es zeitlich nicht mehr möglich diese Versuche mit neuen Extrakten zu wiederholen. Daher muss die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die hier berechneten absoluten Proteinkonzentrationen vorläufige Befunde darstellen, die mit der nunmehr etablierten Methode einer Bestätigung bedürfen. Es ist anzunehmen, dass die Kontrollwerte, welche die Menge an SigB, RsbW und RsbV vor Stressinduktion wiedergeben, aufgrund der niedrigen Konzentration dieser Proteine in der Zelle, zu hoch bestimmt wurden und sich die Induktionsstärke von SigB, RsbW und RsbV nach Korrektur der Eichreihe insgesamt noch deutlich erhöhen wird.

Die relativen Mengen der Proteine zueinander ergaben in den Kontrollen vor Stresseinwirkung ein Verhältnis von (SigB:RsbW:RsbV = 1:2:4) (Abschnitt 4.1.5. „Ergebnisse“), wobei RsbV phosphoryliert vorliegt. Nach Ethanolstress kam es zu einem 3-4fachen und nach Hitze- und Salzstress zu einem 2-3fachen Anstieg der Proteinmenge. RsbW und RsbV nahmen nach Hitze- und Salzstress mengenmäßig gleichstark zu. Nach Ethanolstress konnte eine etwas höhere Menge an RsbV gegenüber RsbW detektiert werden. Wie oben erläutert wurden die Proteinmengen wahrscheinlich zu niedrig bestimmt. Trotzdem zeigen die Verhältnisse der Proteine zueinander, dass eine Regulation durch die mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese bestimmte RsbW<sub>2</sub>:SigB<sub>1</sub>- und RsbV<sub>2</sub>:RsbW<sub>1</sub>-Komplex-Stöchiometrie (Abb. 12, 13, 14) möglich ist. Nach diesem Modell liegen SigB und RsbW in der Zelle in genau abgestimmten Verhältnissen vor. Hervorzuheben ist auch, dass in der Zelle vor Stressinduktion schon die doppelte Menge an RsbV-P im Vergleich zu RsbW vorhanden ist. Dieses schon vorliegende RsbV-P kann, nach Dephosphorylierung, RsbW sofort wegfangen. Die hohe Menge an RsbV gewährleistet eine sehr schnelle Freisetzung des schon vorhandenen Sigmafaktors. Da SigB und RsbW vermutlich translational gekoppelt sind, wäre zu erwarten, dass sich das Mengenverhältnis beider nach Stress nicht ändert. Die in dieser Arbeit gefundene Menge an RsbV widerspricht nicht der Annahme von Heterotetrameren (Dufour & Haldenwang 1994, Alper et al. 1996) für RsbW/SigB- und auch RsbV/RsbW-Komplexe, da „in vivo“ immer nur eine partielle Komplexbildung erfolgt.

Bislang existiert keine vollständige Struktur eines Sigmafaktors. Als Grund wird vermutet, dass Sigmafaktoren in ihrer Konformation vermutlich relativ flexibel sind. Da eine Kristallstruktur sehr dazu beitragen würde, viele Fragen bezüglich der Stöchiometrie, den Interaktionen des Sigmafaktors mit Regulatorproteinen oder der RNA-Polymerase zu beantworten, erschien es äußerst attraktiv, in dieser Arbeit Bedingungen für eine

Kristallisierung von SigB zu finden (Abschnitt 4.1.6. „Ergebnisse“). In der Hoffnung den Sigmafaktor zu stabilisieren und so die Bildung von Kristallen zu forcieren, wurde die Strategie der Kristallisation eines „in vitro“ gewonnenen RsbW/SigB-Komplexes gewählt. Campell and Darst (2000) waren in der Analyse des „in vivo“ hergestellten SigF/SpoIIAB-Komplexes mit verschiedensten biochemischen Methoden sehr erfolgreich. Die Stöchiometrie dieses Komplexes konnte wie schon erwähnt mit SpoIIAB<sub>2</sub>:SigF<sub>1</sub> angegeben werden. SigF war im Komplex gegen tryptischen Verdau resistent, während es als einzeln vorliegendes Protein schnell abgebaut wurde. Die Proteolysedaten zeigten, dass der Antisigmafaktor SpoIIAB an mehrere konservierte Regionen des Sigmafaktors SigF bindet.

Durch gemeinsame „in vitro“-Inkubation von SigB und RsbW im Verhältnis 1:2 konnte der Komplex auf einfache Weise gebildet werden. Nicht gebundene Proteine wurden über eine nachfolgende Gelfiltration abgetrennt. In Kooperation mit Milton Stubbs wurde mit den frisch verwendeten RsbW/SigB-Komplexen versucht, die Bildung von Kristallen in einem Standardpufferkit zu erreichen. Bedauerlicher Weise hatten sich in keinem der Ansätze Kristalle gebildet.

## 5.2. Regulation der SigB-Antwort bei Wachstum in der Kälte

Die Änderung der Temperatur ist einer der Stressfaktoren, denen alle lebenden Organismen ausgesetzt sind (Phadtare et al. 2000). Zur Kälteshockantwort von *B. subtilis* liegen schon eine Reihe von Befunden vor. Um die Probleme darzustellen, denen *B. subtilis* als mesophiles Bakterium bei Kälte ausgesetzt ist, soll zunächst ein Überblick über die vielfältigen, durch Kälteschock induzierten Anpassungsstrategien gegeben werden. Zu den Problemen, mit denen sich Mikroorganismen bei niedriger Temperatur auseinandersetzen müssen, zählen eine geringe Membranfluidität, eine zu hohe superhelikale Dichte der DNA, Erniedrigung der Enzymaktivität, verringerte Proteinfaltungsgeschwindigkeit und eine verminderte Funktionsfähigkeit der Ribosomen, insbesondere bei der Initiation der Translation.

Bei 37°C wird die Membranintegrität in *B. subtilis* durch verzweigte und unverzweigte Membranlipide erhalten, welche vollständig gesättigt sind (Grau & de Mendoza 1993, Kaneda 1991). In *E. coli* wird die Membranfluidität bei niedriger Temperatur durch die erhöhte Aktivität der ACP-Synthetase II gewährleistet, welche ungesättigte Fettsäuren synthetisiert (Cronan & Rock 1996). Im Gegensatz dazu, erhält *B. subtilis* die Membranfluidität durch einen Isoleucin-abhängigen Umbau des Fettsäure-Verzweigungsmusters von Iso-verzweigten gesättigten Fettsäuren zu Antiiso-verzweigten,

gesättigten Fettsäuren (Klein et al. 1999). Zusätzlich werden mit Hilfe der Fettsäure-Desaturase Des isoleucinabhängig Antiiso-verzweigte, gesättigten Fettsäuren „de novo“ synthetisiert (Weber et al. 2001). Von Aguilar et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass die Transkription des Gens der Desaturase (*des*) durch ein Zwei-Komponenten-System bestehend aus einer membranständigen Sensorkinase DesK und einem Response-Regulator DesR temperaturabhängig reguliert wird.

Nach Erniedrigung der Temperatur kommt es in der DNA zu einer Erhöhung des negativen Supercoils (Grau et al. 1994). In *E. coli* konnte nachgewiesen werden, dass beide Untereinheiten der Gyrase zu den Kältestress-induzierten Proteinen (CIP's = cold stress-induced proteins) gehören (Jones & Inouye 1994). Daraus wurde geschlossen, dass die Änderung der DNA-Topology auf dieses Enzym zurückzuführen ist.

Das cytosolische Proteinexpressionsmuster ändert sich ebenfalls drastisch. Die Synthese der meisten Proteine nimmt bei niedriger Temperatur ab, wohingegen die CIP's nach der Temperaturabsenkung von 37°C auf 15°C für eine Stunde transient induziert werden. Zwei Stunden nach dem Kälteshock konnte in 2D-Gelen ein wiederum verändertes, an die Kälte angepasstes Proteinmuster beobachtet werden (Graumann et al. 1996). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass sich Kälte- und Hitzeshockantwort gegenseitig ausschließen (Jones & Inouye 1994). In *B. subtilis* war nach Hitzeshock generell festzustellen, dass die Synthese der Kälteschockproteine, CSP's (CSP = cold shock proteins), abnimmt und die der Hitzeshockproteine und generellen Stressproteine ansteigt (Graumann et al. 1996). CIP's sind sowohl an der Transkription, Translation, Proteinfaltung, dem generellen Metabolismus, der Chemotaxis, sowie auch an der Aufnahme von Kohlenstoff und Eisen beteiligt. Ein die Proteinfaltung zeitlich begrenzender Schritt besteht in der Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindungen, welches die Aufgabe der Prolyl-Cis/Trans-Isomerasen ist (Göthel & Marahiel 1999). Nach Kälteschock werden in *B. subtilis* die zu den CIP's gehörenden Prolyl-Cis/Trans-Isomerasen PPIB und Tig verstärkt synthetisiert (Graumann et al. 1996). Die in *E. coli* und *B. subtilis* am stärksten induzierten CIP's gehören zu den Kälteschockproteinen, welche eine geringe molekulare Masse (7-7,5 kDa) aufweisen und auch in entfernten Bakteriengattungen hochkonserviert sind (Graumann & Marahiel 1998, Yamanaka et al. 1998). Sie werden nicht nur nach Kälteshock induziert, sondern gehören auch in der stationären Phase zu den vermehrt synthetisierten Proteinen (Graumann & Marahiel 1999). Für CspA aus *E. coli* konnte Chaperon-Aktivität nachgewiesen werden (Jiang et al. 1997). CSP's besitzen ein gemeinsames „Fünf-Strang- $\beta$ -barrel“-Faltungsmuster (Schindlin et al. 1993, Schnuchel et al. 1993) und weisen konservierte Motive für die Bindung von ssDNA und RNA auf (Schröder et al. 1995). Diese Ergebnisse haben zu dem Model geführt, dass

CSP's während der Transkription an die naszierende mRNA-Kette binden und die Ausbildung von Sekundärstrukturen während der Translation verhindern. Da die Affinität der CSP's zu RNA niedrig ist, können sie durch die Ribosomen leicht verdrängt werden, so dass eine effiziente Translation gewährleistet ist (Graumann et al. 1997).

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass das SigB-abhängige Regulon nach Einwirkung verschiedenster, wachstumsinhibierender Faktoren induziert wird. Zu diesen Faktoren zählen Hitzeschock, Glukose-, Sauerstoff- und Phosphatlimitation, Behandlung mit Entkopplern der Atmungskette oder Salzstress (Alper et al. 1994; Benson & Haldenwang 1993 b, 1993 c; Boylan et al. 1993; Boylan et al. 1992, Maul et al. 1995, Völker et al. 1995 b, Wise & Price 1995). Neben vielen anderen potentiellen Stressoren untersuchte Andrea Völker (1999) im Rahmen ihrer Dissertation, ob SigB durch Kälteschock induziert wird. Dabei wurde für den WT und eine *rsbU*-Mutante eine Anschaltung für *sigB* und *gsiB* gefunden, die aber bedeutend schwächer ausfiel als bei Hitze, Salz und Ethanol. Hoffmann et al. (unveröffentlichte Daten) gelang es nachzuweisen, dass die Anschaltung des SigB-Regulons nicht direkt nach dem Umsetzen von 37°C auf 15°C zu suchen ist, sondern erst nach einer ersten initialen Adaptionsphase auftritt. Beim Vergleich von Proteinsyntheseproben von Kulturen, die bei 37°C oder 15°C inkubiert wurden, konnte eine klare Expression der SigB-abhängigen Proteine gefunden werden. Abdallah Bashir konnte im Rahmen seiner Diplomarbeit zeigen, dass die Sporulation bei 4°C nicht induziert werden kann und daher als Schutzmechanismus nicht zur Verfügung steht. Es wäre also möglich, dass bei niedrigen Temperaturen die kontinuierliche Expression der generellen Stressgene eine besonders wichtige Rolle für das Überleben von *B. subtilis* spielt. Es war Ziel des Hauptteils dieser Dissertation, die von Hoffmann et al. (unveröffentlichte Daten) entdeckte Induktion des generellen Stressregulons bei niedriger Temperatur einer genaueren Analyse zu unterziehen.

Zur Klärung der sich anschließenden Frage, ob die Integration des Kältesignals durch die RsbP-Phosphatase (Vijay et al. 2000) oder mittels der RsbU-Phosphatase (Yang et al. 1996) vermittelt wird, wurden vergleichende Western-Blot-Analysen von isogenen Stämmen, denen jeweils ein oder zwei Regulatoren (*rsbU*, *rsbP*, *rsbUP*, *rsbV*) fehlten, mit dem WT und einer *sigB*-Mutante unternommen. Das Wachstum in der Kälte konnte bei 16°C untersucht werden, da Vorexperimente (Daten nicht gezeigt) ergeben hatten, dass das SigB-Regulon schon bei einer Reduktion der Temperatur von 37°C auf 16°C induziert wurde. Zugleich konnte das Wachstum der *sigB*-Mutante erreicht werden. Für eine Abschätzung der Stärke der Kälteinduktion wurden in die Analyse zusätzlich Proben einer während des

exponentiellen Wachstums geernteten Kultur und einer, für eine Stunde mit 4% Ethanol behandelten Kultur einbezogen.

Wie in der Einleitung detailliert beschrieben, hängt die Induktion des SigB-Regulons allein vom Phosphorylierungsstatus des RsbV-Proteins ab. Die Phosphorylierung von RsbV am Serin56 durch die Kinaseaktivität von RsbW führt zur Inaktivierung von RsbV, wodurch RsbW aus dem RsbV/RsbW-Komplex entlassen wird und durch Komplexierung des Sigmafaktors SigB die Expression des Stressregulons unterbindet (Alper et al. 1996, Dufour & Haldenwang 1994). Die Dephosphorylierung von RsbV durch die Umweltstress-abhängige Phosphatase RsbU (Yang et al. 1996) oder die durch metabolischen Stress aktivierte Phosphatase RsbP (Vijay et al. 2000) führt zur Bildung des RsbV/RsbW-Komplexes, wodurch nicht mehr genügend RsbW zur vollständigen Komplexierung von SigB zur Verfügung steht. SigB wird freigesetzt und kann mit der RNA-Polymerase interagieren.

Im Western-Blot (Abb. 18) konnte gezeigt werden, dass bei Wachstum in der Kälte eine Akkumulation von SigB, RsbW und RsbV sowohl in den *rsbU*- und *rsbP*-Einzelmutanten als auch in der *RsbUP*<sup>-</sup>-Doppelmutante nachzuweisen war. Die Intensität der Induktion war vergleichbar mit der, welche ein mit Ethanol behandelter Wildtypextrakt zeigte. Damit war nachgewiesen, dass bei Wachstum in der Kälte die Anschaltung des SigB-Regulons unabhängig von den beiden bekannten Phosphatasen RsbU und RsbP erreicht wird. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Anti-Antisigmafaktormutante *RsbV*<sup>-</sup> in die Untersuchung einbezogen.

1993 wurde von zwei Arbeitsgruppen (Benson und Haldenwang 1993 a, Boylan et al. 1993) berichtet, dass nach Hitzeshock eine Akkumulation von SigB in einer *RsbV*<sup>-</sup>-Mutante beobachtet werden konnte, was als Nachweis einer *RsbV*-unabhängigen SigB-Aktivierung gewertet wurde. Es wurde daraufhin vermutet (Benson und Haldenwang 1993 a), dass RsbW entweder thermolabil ist oder durch einen noch unbekannten Mechanismus inaktiviert wird. In einer detaillierten Untersuchung von Hitzestress konnte gezeigt werden, dass die *RsbV*-unabhängige Regulation zwar zu beobachten war, aber eine untergeordnete Rolle spielt (Völker et al. 1995 b). In RNA-Quantifizierungsexperimenten konnte (Völker et al. 1995 b) eine 25fach erhöhte Menge an *sigB*-mRNA im WT gefunden werden. *rsbU*- und *rsbV*-Mutanten hingegen zeigten nur eine 4-5fache Erhöhung. RNA-Analysen des SigB-abhängigen Gens *gsiB* wiesen eine 500fache RNA-Menge in einem mit Hitze behandelten WT auf, wohingegen die *RsbV*<sup>-</sup>-Mutante nur eine sechsfache Induktion zeigte. In Western-Blot-Analysen konnte außerdem eine *RsbW*-Akkumulation in der *rsbV*-Mutante ausgeschlossen werden. Diese Daten wiesen nach, dass die beobachtete Erhöhung des

SigB-Levels in der *rsbV*-Mutante unabhängig von der SigB-Induktion war und die Antwort nach Hitzeschock analog zu den anderen Umweltstressarten ein RsbU- bzw. ein RsbV-abhängiger Prozess war.

Für die bisher als SigB-induzierend identifizierten Stressarten ist ein intaktes *rsbV*-Gen also zwingend notwendig (Benson & Haldenwang 1992, Benson & Haldenwang 1993 b, Boylan et al. 1992, Völker et al. 1995 b). Um so unerwarteter war das Ergebnis des Western-Blots (Abb. 18), welches eine klar erhöhte Menge der Proteine SigB und RsbW im 16°C-Extrakt einer RsbV-Mutante zeigte. Anhand des zusätzlich detektierten Proteins RsbU, welches nach Einwirkung verschiedener Stimuli keine Veränderung in der Menge zeigte, konnte sicher gestellt werden, dass in allen Spuren gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Die als Negativkontrolle dienende SigB<sup>-</sup>-Mutante zeigte im Vergleich zum WT keine signifikante Erhöhung der Menge an RsbW und SigB. Dennoch schien die *sigB*-Mutante im Vergleich zu früheren Experimenten (in Vollmedium oder dem früher verwendeten Belitzky-Minimalmedium) ein leicht höheres Basalniveau an RsbW und RsbV aufzuweisen. Im direkten Vergleich von Vollmedium und dem hier verwendeten Minimalmedium konnte bei der SigB<sup>-</sup>-Mutante bei 37°C ein etwas höheres Basalniveau an RsbW und RsbV im Minimalmedium festgestellt werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass es sich hierbei um eine SigB-unabhängige, medienspezifische Erhöhung der Menge dieser Proteine in SMM handelt, was auf die weiteren Untersuchungen aber keinen Einfluss hatte.

Die in den Western-Blot-Analysen erhaltenen Daten wurden durch Messung von *ctc::lacZ*-Reporterfusionen erhärtet. Die einzelnen, im Western-Blot getesteten Mutanten wurden mit einer *ctc::lacZ*-Reporterfusion transformiert, wobei *lacZ* für die  $\beta$ -Galaktosidase codiert. Auch hier konnte eine klare Anschaltung im Wildtyp und in den Mutanten RsbP<sup>-</sup>, RsbU<sup>-</sup>, RsbUP<sup>-</sup> und RsbV<sup>-</sup> beobachtet werden (Abb. 19 A-D). Wie erwartet zeigte die SigB<sup>-</sup>-Mutante keine Induktion. Bei 37°C (Abb. 20 und 21) konnte ein etwas niedrigeres Basalniveau im Vergleich zu 16°C (Abb. 19 B/D) festgestellt werden, was in der bei Kälte erhöhten Stabilität der  $\beta$ -Galaktosidase begründet liegt. Die im WT und den Mutanten während des Wachstums bei 16°C gemessenen LacZ-Werte lagen im Vergleich zu bisher getesteten SigB-induzierenden Stressarten deutlich höher. Ein in SMM durchgeführter Ethanolstress zeigte im WT eine maximale Anschaltung von etwa 80 MU. Bei Wachstum in der Kälte wurden etwa 12fach höhere Werte im WT erreicht. Die Bestimmung der Aktivität der *ctc::LacZ*-Fusion nach dem Umsetzen zeigte, dass die eigentliche SigB-Aktivierung abgesehen von einer schwachen initialen Phase bei 5-8 Stunden erst nach etwa 20 Stunden Wachstum in der Kälte erfolgt. In dem kältetoleranten Bakterium *Listeria monocytogenes*, welches SigB-, RsbW-, RsbV- und RsbX-Homologe von *B. subtilis* besitzt (Becker et al.



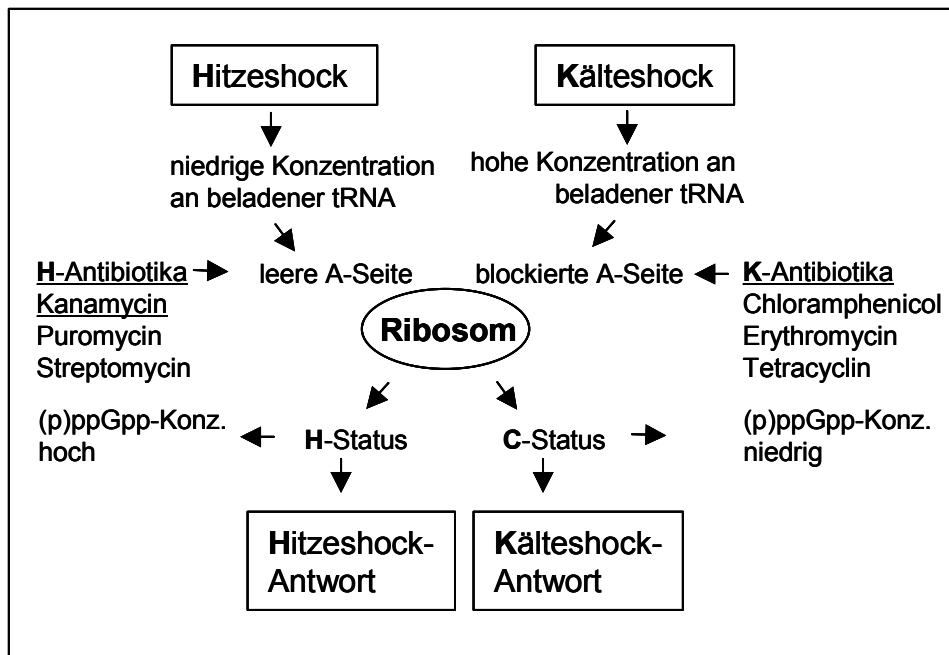
1998), wurde bei einer Temperaturänderung von 37°C auf 8°C ebenfalls eine SigB-Induktion nachgewiesen (Becker et al. 2000). In diesem Organismus konnte eine verstärkte SigB-Induktion nach etwa 6 Stunden gemessen werden. Vorkommen und Aktivierung von SigB in einem kältetoleranten Organismus sind ein weiterer Hinweis dafür, dass SigB wichtig für die Anpassung und das Überleben bei Kälte ist.

Die *ctc::lacZ*-Messungen (Abb. 19 A-D) ergaben weiterhin, dass die Aktivierung von SigB über den gesamten verfolgten Wachstumsverlauf von 150 Stunden auf dem, von den einzelnen Mutanten jeweils erreichten, erhöhten Niveau bestehen blieb. Die während des Wachstumsverlaufes beobachteten, teilweise zyklischen Schwankungen der einzelnen Messwerte können noch nicht mit absoluter Sicherheit eingeordnet werden. Neben dem Argument, dass es sich um Fehler handelt, welche durch das notwendige Verdünnen des Assays hervorgerufen wurden, ist es möglich, dass die SigB-Antwort kontinuierlich ab- und wieder angeschaltet wird. Das würde bedeuten, dass auch dieser Stress die für SigB typische transiente Antwort zeigt. Der transiente Charakter der SigB-Antwort gilt bei allen bisher gefundenen SigB-induzierenden Stressarten als ein charakteristisches Merkmal (Dufour et al. 1996, Völker et al. 1995 b).

Ein wichtiger Aspekt der folgenden Untersuchungen bestand in dem Nachweis, dass RsbW und RsbV während des Wachstums in der Kälte stabil sind und nicht der Proteolyse unterliegen. Würde der Antisigmafaktor RsbW bei niedrigen Temperaturen abgebaut werden, könnte ein Teil von SigB nicht mehr durch Bindung an RsbW inaktiviert werden und wäre entsprechend in der Lage mit der RNA-Polymerase zu interagieren. Das Proteolyse auch für die Aktivierung des sporulationsspezifischen Sigmafaktors SigF eine entscheidende Rolle spielt, wurde erst vor kurzem entdeckt. Der Antisigmafaktor SpoIIAB ist nur stabil, solange er im Komplex entweder mit SpoIIAA oder SigF gebunden ist. Als einzeln vorliegendes Protein wird SpoIIAB durch die ClpCP-Protease abgebaut. Das auf diese Weise erzeugte Ungleichgewicht der SpoIIAB- und SigF-Mengen wird als ein entscheidender Mechanismus für die Aktivierung von SigF angesehen (Pan et al 2001). Wie durch Mutation einzelner Reste herausgefunden werden konnte, waren die letzten drei Reste am C-Terminus von SpoIIAB entscheidend für dessen Instabilität. Diese dienen wahrscheinlich als Erkennungssequenz für die Protease. Die Erkennungssequenz unterscheidet sich dabei deutlich von der anderer bekannter ClpCP-Substrate (Pan et al 2001). Daher wird angenommen, dass ClpCP in der Lage ist, Substrate mit verschiedenen, nicht homologen Sequenzen zu erkennen (Pershuh et al 1999, Krüger et al 2001).

Die Stabilität von RsbW, RsbV und auch SigB wurde bei 16°C untersucht, indem die Proteinbiosynthese in der exponentiellen Phase durch Zugabe eines Inhibitors der Translation unterbunden wurde (Abb. 23 A) und während der folgenden acht Stunden Proben gezogen wurden. Die Analyse im Western-Blot (Abb. 23 B) ergab, keine Hinweise für den Abbau von RsbW bei niedrigen Temperaturen. Die Menge der einzelnen Proteine blieb entsprechend den bisher untersuchten Stressarten, wie zum Beispiel Hitze-, Salz- oder Ethanolstress, konstant. Eine andere Möglichkeit die Menge an RsbW während des Wachstums in der Kälte zu reduzieren, wäre, dass die Mengen an RsbW und SigB ungleichmäßig zunehmen und sich daraus, in einem gewissen Zeitfenster, ein Überschuss an SigB ergibt. Um das zu prüfen, wurden Proben für einen Western-Blot direkt nach dem Umsetzen der Kulturen von 37°C zu 16°C und mehrere Proben während des Wachstums in der Kälte genommen (Abb. 24 A) . Im Western-Blot (Abb.24 B) konnte die gleichmäßige Zunahme der Mengen an SigB, RsbV und besonders RsbW um das achtfache während des Kältestresses gezeigt werden. Damit war gesichert, dass SigB, RsbV und RsbW auch bei niedrigen Temperatur eine unveränderte Stabilität aufweisen und zeitgleich in äquivalenten Mengen vorliegen.

Bisher ist noch für keinen SigB-induzierenden Stimulus geklärt, über welche Mechanismen das Signal von *B. subtilis* wahrgenommen wird. Für *E. coli* wurde schon 1990 (VanBogelen & Neidhardt 1990) ein Modell (Abb. 33) propagiert, in welchem Ribosomen als Sensor für Hitze- und Kälteschock fungieren. Dabei messen die Ribosomen die Konzentration an beladener tRNA in der A-Seite. Nach Hitzeshock erfolgt die Translation schneller, als beladene tRNAs bereitgestellt werden können, was zu einer leeren A-Seite im Ribosom führt. Dieser Zustand konnte auch durch H-Antibiotika (H = Hitze, so genannt, weil sie auf das Ribosom und die Translation Hitzeschock-spezifische Auswirkungen haben) wie z.B. Streptomycin hervorgerufen werden. Die leere A-Seite wurde als Signal angesehen, welches die Hitzeschockantwort induzierte und außerdem die Konzentration an (p)ppGpp erhöhte. Umgekehrt führte der Kälteschock zu einer reduzierten Translationskapazität, wodurch die A-Seite durch beladene tRNAs blockiert wird, was die Kälteschockantwort auslöst und die Menge an (p)ppGpp erniedrigt. Dieser Effekt konnte auch durch K-Antibiotika (K=Kälte) wie Chloramphenicol, welches die Peptidyl-Transferase inhibiert, bewirkt werden. Dieses Modell wird auch für *B. subtilis* diskutiert, da die Kälteschockantwort auch in diesem Organismus durch Inhibition der Translation induziert werden konnte (Graumann et al. 1997).



**Abb. 33 Modell von VanBogelen und Neidhardt (1990): Das Ribosom als Temperatursensor in Bakterien (Graphik aus Graumann & Marahiel [1996] entnommen).**

Es wird angenommen, dass Membranen Umweltveränderungen messen und durch den Transfer von Signalen ins Zellinnere die Transkription aktivieren (Hoppe et al. 2000, Suzuki et al. 2000, Vigh et al. 1998). Die Signaltransduktion erfolgt über Zwei-Komponentensysteme, welche gewöhnlich aus einer Histidinkinase (Sensor) und einem Response Regulator (Effektor) bestehen (Hoch 2000). Dabei reagiert die Sensorkinase als integrales Membranprotein auf Umweltsignale (Dutta et al. 1999). Es konnte gezeigt werden (Aguilar et al. 2001), dass die Synthese des Gens der Desaturase *des* durch ein Zwei-Komponenten-System reguliert wird. Dabei bindet der „Response Regulator“ DesR als positiver Regulator an die DNA-Sequenz nahe am Startcodon des „*des*“-Gens. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die ungesättigten Fettsäuren als Produkt der Desaturase als Signalmoleküle wirken und die Transkription negativ beeinflussten. Dieser „regulatorische Bogen“ stellt nicht nur ein neues Zwei-Komponenten-Signaltransduktions-System dar, sondern auch einen neuen Mechanismus der Genexpression bei niedrigen Temperaturen. Hier wird zum ersten Mal ein Mechanismus beschrieben, wo ein Transkriptionsfaktor direkt auf eine Temperatur-regulierte Histidinkinase antwortet und als molekularer Schalter für die regulierte Transkription eines kälteinduzierten Gens agiert.

In *E. coli* wird die Expression von Hitzeshockproteinen positiv durch die Menge des alternativen Sigmafaktors Sig32 reguliert, welcher durch das *rpoH*-Gen codiert wird (Gross 1996, Yura et al. 1993). Ein alternativer Mechanismus der temperaturabhängigen Expression von Genen wurde in diesem Zusammenhang von Morita et al. (1999)

beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Sig32-mRNA bei 37°C eine ausgeprägte Sekundärstruktur aufweist, welche erst bei hohen Temperaturen aufgeschmolzen wird und die Ausbildung des mRNA-30S-Ribosomen-tRNA-Komplexes erlaubt.

Diesem Modell entsprechend, wäre es in Bezug auf die SigB-Aktivierung bei niedriger Temperatur denkbar, dass die Expression eines bei 37°C synthetisierten Negativregulators durch die Ausbildung von mRNA-Sekundärstrukturen inhibiert wird. Die Funktion dieses hypothetischen Negativfaktors wäre, ein SigB-aktivierendes Protein durch direkte Protein-Interaktion zu inaktivieren. Bei niedriger Temperatur würde das SigB-aktivierende Protein, wegen einer fehlenden Neusynthese und einer Ausverdünnung des noch vorhanden Negativregulators, freigesetzt werden und könnte beispielsweise SigB aus dem Komplex mit RsbW herauslösen und SigB auf diese Weise aktivieren. Diese Überlegung wäre mit dem Ergebnis vereinbar, dass die SigB-Antwort bei niedriger Temperatur mit einer Verzögerung von etwa 20 Stunden einsetzt.

Für das Verständnis der SigB-abhängigen Regulation bei niedrigen Temperaturen erschien es sinnvoll zu untersuchen, ob die Bildung der RsbW/SigB- und RsbV/RsbW-Komplexe prinzipiell noch möglich ist. Dazu wurden die Temperaturen 4°C und 15°C getestet. Für die „in vitro“-Untersuchungen wurden die aus *E. coli* gereinigten Proteine SigB, RsbW und RsbV einzeln bei den entsprechenden Temperaturen präinkubiert und dann SigB und RsbW bzw. RsbV und RsbW zusammengegeben. Die Analyse der Komplexe im Nativgel (Abb. 25) ergab, dass die Komplexe bei niedrigen Temperaturen geformt wurden. Dieser Ansatz erlaubt allerdings keine Aussagen zur Kinetik der Komplexbildung. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die *B. subtilis*-Proteine in ihrer natürlichen Umgebung bei Kälte modifiziert werden (z.B. posttranslationale Modifikation), in veränderter oder falschgefalteter Konformation vorliegen, was möglicherweise die Komplexe RsbW/SigB oder RsbV/RsbW in *B. subtilis* verhindern würde.

Zur detaillierten Charakterisierung der „in-vivo“-Wechselwirkungen von SigB, RsbW und RsbV wurden bei unterschiedlichen Bedingungen gezogene Zellen mit Hilfe der Gelfiltrationsanalyse untersucht. Diese Methode wurde schon sehr erfolgreich zum Nachweis der RsbW/SigB- und RsbV/RsbW-Komplexe im Rohextrakt eingesetzt (Dufour & Haldenwang 1994). Im Vergleich zur der bei 37°C gezogenen Kontrollkultur (Abb. 26 A) konnte in der Kältekultur (Abb. 26 B) und der ethanolbehandelten Kultur (Abb. 26. C) eine deutlich verstärkte Akkumulation von SigB, RsbW und RsbV im Western-Blot beobachtet werden. In der Kontrolle waren außerdem deutlich zwei RsbW-Peaks zu unterscheiden. Der Peak im Bereich von 66 kDa zeigte RsbW assoziiert mit SigB und im zweiten Peak (im

Bereich von 29 kDa) lag RsbW vermutlich als Dimer vor. Vergleicht man die Verteilung von SigB, RsbW und RsbV im Blot des 16°C-Extraktes mit dem einer ethanolbehandelten Kultur, so fällt auf, dass sich das RsbV-Verteilungsmuster bei beiden Proben gravierend unterscheidet. Während etwa die Hälfte von RsbV in der mit 4% Ethanol behandelten Probe mit RsbW assoziiert vorlag, konnte im 16°C-Extrakt fast kein RsbV in den RsbW-Fractionen detektiert werden. Bei 16°C war keine signifikante Menge an RsbV/RsbW-Komplex zu finden. RsbV lag im Kälteextrakt ungebunden und als Monomer vor (13 kDa), was darauf schließen lässt, dass RsbV nicht durch einen unbekannten Regulator an der Interaktion zwischen RsbW und RsbV gehindert wird, außer diese Bindung würde durch die Gelfiltration zerstört.

Im 2D-Gel können die Formen RsbV und RsbV-P aufgrund ihres unterschiedlichen pI-Wertes sehr gut von einander getrennt werden, wie frühere Studien zum Phosphorylierungsstatus von RsbV unter verschiedensten Stressbedingungen (Völker et al. 1996) zeigen konnten. Eine Analyse des RsbV-Phosphorylierungsstatus unter Nutzung der 2D-Gelelektrophorese (Abb. 28) wies nach, dass das einzeln vorliegende RsbV nicht phosphoryliert war. Möglicherweise kann RsbV bei niedrigen Temperaturen nicht mehr durch RsbW phosphoryliert werden. Ein Grund dafür wäre, dass die Kinaseaktivität von RsbW bei niedrigen Temperaturen funktioniert.

Im Vergleich zur exponentiellen Phase konnte beim 16°C-Extrakt, ebenso wie in der ethanolbehandelten Kultur, in der Gelfiltration eine deutliche Verschiebung der SigB-Bande aus dem RsbW/SigB-Komplex hin zum hochmolekularen 440-kDa Bereich festgestellt werden. In den gestressten Kulturen lagen ca. 50% von SigB assoziiert mit der RNA-Polymerase vor, was ein Zeichen für aktive Transkription der SigB-abhängigen Gene ist. Im Gegensatz dazu lag SigB in der exponentiellen Phase zu etwa 80% im Komplex mit RsbW vor.

Die Western-Blot-Analysen, die Messungen der *ctc::LacZ*-Fusion und die Gelfiltrationsexperimente weisen gemeinsam nach, dass es sich bei Wachstum in der Kälte um den ersten SigB-induzierenden Stress handelt, welcher RsbV-unabhängig vermittelt wird. In mit Silbernitrat gefärbten 2D-Gelen (Abb. 29 A) einer RsbV-Mutante konnte anhand des Proteinsynthesemusters nachgewiesen werden, dass die zum SigB-Regulon gehörenden Proteine exprimiert werden. Die Stärke der Expression war in der RsbV-Mutante deutlich höher als im WT und schien im Bereich einer RsbX-Mutante zu liegen. Allerdings müssten für einen quantitativen Vergleich mehrere Proben vom WT, einer RsbV- und einer RsbX-

Mutante während des Wachstums bei 16°C gezogen werden, um von allen Stämmen parallel eine 2D-Gel-Kinetik anfertigen zu können.

#### 5.2.1. DnaJ, ein Regulator der SigB-Aktivität bei Wachstum in der Kälte?

Haga et al. (2001) stellten die These auf, dass die DnaK/DnaJ-Chaperon-Maschinerie in die Regulation der SigB-Aktivität involviert ist. Die interessanten Ergebnisse sollen hier kurz zusammengefasst werden. Im Hefe-Zwei-Hybriden-System konnten Interaktionen zwischen SigB und DnaJ nachgewiesen werden. LacZ-Messungen einer *DnaJ*<sup>-</sup>-Mutante zeigten, sowohl nach Ethanolbehandlung als auch nach Eintritt in die stationären Phase, eine um die Hälfte reduzierte SigB-Anschaltung. Die gewonnenen Erkenntnisse unterstützten die Vermutung, dass DnaK und DnaJ möglicherweise die Aktivität von SigB durch direkte Proteininteraktionen kontrollieren oder auf die Komplexe zwischen SigB, RsbW und RsbV einwirken. Weitergehend wurde vermutet, dass diese Chaperone die Funktion eines Stress-Sensorsystems unabhängig von der RsbV-Dephosphorylierung wahrnehmen. Die allgemeinen Vermutungen über einen vom RsbV-Phosphorylierungsstatus unabhängigen Weg korrelieren mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen zur Aktivierung von SigB bei Wachstum bei niedriger Temperatur. Transkriptionsanalysen (Homuth et al. 1997) des an der Hitzeshockantwort beteiligten *dnaK*-Operons hatten zusätzlich zu den bereits bekannten Genen (*hrcA*, *grpB*, *dnaK*, *dnaJ*), drei neue Gene, *yqeT*, *yqeU* und *yqeV*, identifiziert. Analysen dieser Gene ließen keine essentielle Funktion für das Wachstum bei hohen Temperaturen oder für die Regulation der Sporulation erkennen (Homuth et al. 1997). Nachdem in dieser Arbeit ein RsbV-unabhängiger Weg der SigB-Aktivierung entdeckt wurde, schien es reizvoll zu prüfen, ob Produkte des *dnaK*-Operons an dieser Regulation beteiligt sind. Die für direkte Analysen notwendigen Mutanten wurden freundlicherweise von Georg Homuth zur Verfügung gestellt, wobei eine *dnaK*-Mutante nicht untersucht werden konnte, da diese in der Fähigkeit zu wachsen stark beeinträchtigt ist. Frühere Studien hatten gezeigt, dass Chaperone wie DnaK und GroEL als Stressaktivatoren nicht in die SigB-Induktion nach Umwelt- und metabolischem Stress involviert sind (Mogk et al. 1998, Scott et al. 1999a).

Die vergleichende Analyse des Wachstums eines Wildtypstammes 168 und der Mutanten bei 16°C ergab für die *dnaJ*-Mutante einen drastischen Wachstumsdefekt, während bei *yqeT*-, *yqeU*- und *yqeV*-Mutanten kein auffälliger Phänotyp festzustellen war (Abb. 31). Die *dnaJ*-Mutante war bei 16°C nicht in der Lage eine optische Dichte von 0,5 zu überschreiten, was zeigte, dass das Chaperon DnaJ unbedingt in der Kälte benötigt wurde. In der sich anschließenden Western-Blot-Analyse (Abb. 32) musste allerdings festgestellt werden, dass eine Aktivität von SigB unverändert zu verzeichnen war. Auch die Vermutung, dass eine

*dnaJ/rsbV*-Doppelmutante die SigB-Antwort unterdrücken könnte, bestätigte sich im Western-Blot nicht. Nach diesen Erkenntnissen konnte die von Haga et al. (2001) vermutete, essentielle SigB-induzierende Funktion von DnaJ aufgrund unserer Ergebnisse für das Kältewachstum ausgeschlossen werden. Einschränkend ist zu betonen, dass keine *dnaJK*-Doppelmutante getestet werden konnte und damit eine Redundanz von DnaK und DnaJ nicht auszuschließen ist.

### 5.2.2. Modell der SigB-Regulation bei Kälte

Die erhaltenen Befunde zeigen deutlich, dass das bestehende Modell der Regulation der SigB-Aktivität zur Erklärung der Aktivierung von SigB bei niedriger Temperatur nicht ausreichend ist. Abb. 34 stellt eine Zusammenfassung des bisherigen Modells dar, welches in der Einleitung (Abb. 2) detailliert beschrieben ist: SigB wird in Folge von Umweltstress (RsbU) oder metabolischem Stress (RsbP) aktiviert, indem der Anti-Antisigmafaktor RsbV durch eine der beiden Phosphatasen dephosphoryliert wird. Daraufhin kann RsbV den Antisigmafaktor RsbW aus dem Komplex mit SigB lösen, so dass freies SigB mit der Core-RNA-Polymerase assoziieren kann. Im Gegensatz dazu wirkt RsbV bei niedriger Temperatur eindeutig nicht als Anti-Antisigmafaktor. Im Gegenteil kann nach den hier erarbeiteten Ergebnissen vermutet werden, dass RsbV für die Induktion der SigB-Antwort auf Kälte keine oder nur eine untergeordnete Bedeutung hat. Das Induktionsprofil der *rsbV*-Mutante im 2D-Gel konnte allerdings zeigen, dass ein Fehlen von RsbV sogar zu einer verstärkten SigB-abhängigen Expression führt. Daher könnte man spekulieren, dass RsbV selbst oder ein mit RsbV interagierendes Protein die Anschaltung negativ beeinflusst. Möglicherweise nimmt auch das als „Feedback-Inhibitor“ bekannte RsbX (Smirnova et al. 1998, Völker et al. 1997) über einen nicht geklärten Weg Einfluss auf die Höhe der Anschaltung. Es konnte gezeigt werden, dass die Integration des Kältesignals nicht über die bisher bekannten Phosphatasen RsbU (Umweltstress) und RsbP (metabolischer Stress) weitergeleitet wird. Die bisher bekannten Regulatoren, einschließlich Obg und RsbQ spielen bei der SigB-abhängigen Kältereulation wahrscheinlich keine entscheidende Rolle, außer möglicherweise über einen Bypass, welcher die Phosphatasen und den Antisigmafaktor umgeht. Einschränkend ist zu erwähnen, dass Obg im Hefe-Zwei-Hybriden-System eine Interaktion mit RsbW gezeigt hat. Es ist zusammenfassend zu vermuten, dass die Signaltransduktion über einen weiteren Regulator direkt an RsbW oder SigB angreift und den RsbW/SigB-Komplex zerstört. Abb. 33 soll diese Überlegungen veranschaulichen.

Das Hitzeshockprotein DnaJ hat entsprechend den hier gewonnenen Erkenntnissen vermutlich keine essentielle Funktion für die SigB-Regulation bei niedriger Temperatur.

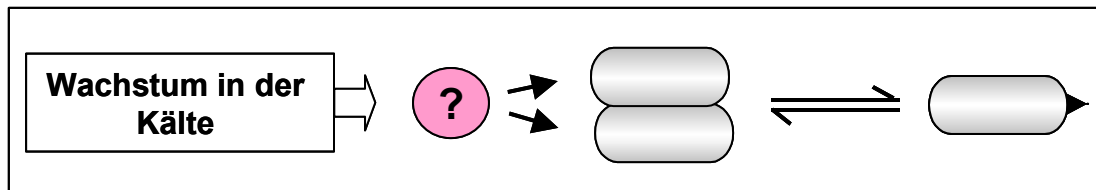


Abb. 34 Regulation von SigB nach Kältestress

### 5.3. Ausblick

Ein Schwerpunkt weiterer Untersuchungen wird sicherlich in der Suche nach einem potentiellen Regulator bestehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *rsbW-sigB-Strep-tag*-Konstrukt in den pSweet-Vektor kloniert, welcher eine Überexpression dieser Gene in *B. subtilis* erlaubt. Unter Nutzung der *Strep-tag*-Affinitätschromatographie sollte es möglich sein, Regulatoren, welche bei niedriger Temperatur an SigB gebunden sind, aus dem Rohextrakt zu isolieren. Das umgekehrte Konstrukt, bei welchem der Tag an *rsbW* angehängt wurde, würde entsprechend die Elution von RsbW mit einem gebundenen Regulator erlauben.



## 6 Literatur

- Aguilar, P. S., J. E. Cronan, Jr., and D. de Mendoza** (1998). A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J. Bacteriol.* **180**:2194-2000.
- Aguilar, P. S., A. M. Hernandez-Arriaga, L. E. Cybulski, A. C. Erazo, and D. de Mendoza** (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *Embo. J.* **20**:1681-1691.
- Akbar, S., T. A. Gaidenko, C. M. Kang, M. O'Reilly, K. M. Devine, and C. W. Price** (2001). New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor SigB of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:1329-1338.
- Akbar, S., C. M. Kang, T. A. Gaidenko, and C. W. Price** (1997). Modulator protein RsbR regulates environmental signalling in the general stress pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **24**:567-578.
- Alper, S., A. Dufour, D. A. Garsin, L. Duncan, and R. Losick** (1996). Role of adenosine nucleotides in the regulation of a stress-response transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **260**:165-177.
- Antelmann, H., S. Engelmann, R. Schmid, A. Sorokin, A. Lapidus, and M. Hecker** (1997). Expression of a stress- and starvation-induced dps/pexB-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor SigB in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**:7251-7256.
- Alper, S., L. Duncan, and R. Losick** (1994). An adenosine nucleotide switch controlling the activity of a cell type-specific transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Cell.* **77**:195-205.
- Arigoni, F., L. Duncan, S. Alper, R. Losick, and P. Stragier** (1996). SpoIIIE governs the phosphorylation state of a protein regulating transcription factor SigF during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:3238-3242.
- Arigoni, F., K. Pogliano, C. D. Webb, P. Stragier, and R. Losick** (1995). Localization of protein implicated in establishment of cell type to sites of asymmetric division. *Science.* **270**:637-640.
- Bahvsar, P.A., Zhao X., and E. D. Brown** (2001). Development and Characterisation of a xylose-dependent system for expression of cloned genes in *Bacillus subtilis*: Conditional Complementation of a teichoic acid mutant. *Appl. Environ. Microb.* **67**:403-410.
- Barilla, D., I. Lucet, A. Kuhlmann, and M. D. Yudkin** (1999). Genotype, phenotype, and protein structure in a regulator of sporulation: effects of mutations in the *spoIIAA* gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:3860-3863.
- Becker, L. A., M. S. Cetin, R. W. Hutkins, and A. K. Benson** (1998). Identification of the gene encoding the alternative sigma factor SigB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J. Bacteriol.* **180**:4547-4554.
- Becker, L. A., S. N. Evans, R. W. Hutkins, and A. K. Benson** (2000). Role of SigB in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J. Bacteriol.* **182**:7083-7087.
- Benson, A. K., and W. G. Haldenwang** (1993 a). *Bacillus subtilis* SigB is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:2330-2334.
- Benson, A. K., and W. G. Haldenwang** (1992). Characterization of a regulatory network that controls SigB expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**:749-757.
- Benson, A. K., and W. G. Haldenwang** (1993 b). Regulation of SigB levels and activity in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **175**:2347-2356.
- Benson, A. K., and W. G. Haldenwang** (1993). The SigB-dependent promoter of the *Bacillus subtilis sigB* operon is induced by heat shock. *J. Bacteriol.* **175**:1929-1935.
- Binnie, C., M. Lampe, and R. Losick** (1986). Gene encoding the sigma 37 species of RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:5943-5947.

- Birnboim, H. C. D. J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. **7**:1513-1523.
- Bloom, H., H. Beier, and H. Gross** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. **8**:93-99.
- Boylan, S. A., A. R. Redfield, and C. W. Price** (1993). Transcription factor SigB of *Bacillus subtilis* controls a large stationary phase regulon. *J. Bacteriol.* **175**:3957-3963.
- Boylan, S. A., A. Rutherford, S. M. Thomas, and C. W. Price** (1992). Activation of *Bacillus subtilis* transcription factor SigB by a regulatory pathway responsive to stationary phase signals. *J. Bacteriol.* **174**:3695-3706.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Brigulla, M.** 1999. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg.
- Brody, M. S., and C. W. Price** (1998). *Bacillus licheniformis* sigB operon encoding the general stress transcription factor SigB. *Gene*. **212**:111-118.
- Brody, M. S., and C. W. Price.** unveröffentlichte Daten.
- Brody, M. S., K. Vijay, and C. W. Price** (2001). Catalytic function of an alpha/beta hydrolase is required for energy stress activation of the SigB transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:6422-6428.
- Campbell, E. A., and S. A. Darst** (2000). The anti-sigma factor SpoIIAB forms a 2 : 1 complex with SigF contacting multiple conserved regions of the sigma factor. *J. Mol. Biol.* **300**:17-28.
- Chan, P. F., S. J. Foster, E. Ingham, and M. O. Clements** (1998). The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor SigB controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J. Bacteriol.* **180**:6082-6089.
- Cronan, J. E., and C. O. Rock** (1996). Biosynthesis of membrane lipids. ASM Press, Washington D.C.
- Cutting, S. M., and P. B. Vander Horn** (1990). Genetic analysis, p. 27-74. In C. R. a. C. Harwood, S.M. (ed.), Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley & Sons Inc., Chichester, UK.
- De Maio, J., Y. Zhang, C. Ko, and W. Bshai** (1997). *Mycobacterium tuberculosis* sigF is part of a gene cluster with similarities to the *Bacillus subtilis* sigF and sigB operons. *Tuber Lung Dis.* **78**:3-12.
- De Maio, J., Y. Zhang, C. Ko, D. B. Young, and W. R. Bishai** (1996). A stationary phase stress response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:2790-2794.
- Delumeau, O., and M. D. Yudkin** (2001). Protein-protein interactions that regulate the activity of SigB, the stress-dependent sigma factor of *Bacillus subtilis*. Functional Genomics of Gram-positive Bacteria, San Diego, California.
- Diederich, B., J. F. Wilkinson, T. Magnin, M. Najafi, J. Errington, and M. D. Yudkin** (1994). Role of interactions between SpoIIAA and SpoIIAB in regulating cell-specific transcription factor SigF of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **8**:2653-2663.
- Dufour, A., and W. G. Haldenwang** (1994). Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J. Bacteriol.* **176**:1813-1820.
- Dufour, A., U. Völker, A. Völker, and W. G. Haldenwang** (1996). Relative levels and fractionation properties of *Bacillus subtilis* SigB and its regulators during balanced growth and stress. *J. Bacteriol.* **178**:3701-3709.
- Duncan, L., S. Alper, F. Arigoni, R. Losick, and P. Stragier** (1995). Activation of cell-specific transcription by a serine phosphatase at the site of asymmetric division. *Science*. **270**:641-644.
- Duncan, L., S. Alper, and R. Losick** (1996). SpoIIAA governs the release of the cell-type specific transcription factor SigF from its anti-sigma factor SpoIIAB. *J. Mol. Biol.* **260**:147-164.

- Duncan, L., and R. Losick** (1993). SpoIIAB is an anti-sigma factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein SigF from *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**:2325-2329.
- Dutta, R., L. Qin, and M. Inouye** (1999). Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* **34**:633-640.
- Dworkin, J., and R. Losick** (2001). Differential gene expression governed by chromosomal spatial asymmetry. *Cell*. **107**:339-346.
- Engelmann, S., and M. Hecker** (1996). Impaired oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis* sigB mutants and the role of katA and katE. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**:63-69.
- Feucht, A., T. Magnin, M. D. Yudkin, and J. Errington** (1996). Bifunctional protein required for asymmetric cell division and cell-specific transcription in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **10**:794-803.
- Fouet, A., O. Namy, and G. Lambert** (2000). Characterization of the operon encoding the alternative sigma(B) factor from *Bacillus anthracis* and its role in virulence. *J. Bacteriol.* **182**:5036-45.
- Frandsen, N., I. Barak, C. Karmazyn-Campelli, and P. Stragier** (1999). Transient gene asymmetry during sporulation and establishment of cell specificity in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **13**:394-399.
- Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, and u. v. m** (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma Genitalium*. *Science*. **270**:397-403.
- Gaidenko, T. A., and C. W. Price** (1998). General stress transcription factor SigB and sporulation transcription factor SigH each contribute to survival of *Bacillus subtilis* under extreme growth conditions. *J. Bacteriol.* **180**:3730-3.
- Gaidenko, T., X. Yang, Y. Lee, and C. Price** (1999). Threonine phosphorylation of modulator protein RsbR governs its ability to regulate a serine kinase in the environmental stress signal pathway of *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **288**:29-39.
- Garsin, D., L. Duncan, D. Paskowitz, and R. Losick** (1998). The kinase activity of the antisigma factor SpoIIAB is required for activation as well as inhibition of transcription factor SigF during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **284**:569-578.
- Gertz, S., S. Engelmann, R. Schmid, K. Ohlsen, J. Hacker, and M. Hecker** (1999). Regulation of SigB-dependent transcription of sigB and asp23 in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol. Gen. Genetics*. **261**:558-566.
- Gothel, S. F., and M. A. Marahiel** (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**:423-436.
- Grau, R., and D. de Mendoza** (1993). Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **8**:535-542.
- Grau, R., D. Gardiol, G. C. Glikin, and D. de Mendoza** (1994). DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **11**:933-941.
- Graumann, P., K. Schröder, R. Schmid, and M. A. Marahiel** (1996). Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**:4611-4619.
- Graumann, P., T. M. Wendrich, M. H. W. Weber, K. Schröder, and A. Marahiel** (1997). A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol. Microbiol.* **25**:741-756.
- Graumann, P. L., and M. A. Marahiel** (1998). A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends in Biochemical Sciences*. **23**:286-290.
- Graumann, P. L., and M. A. n. Marahiel** (1999). Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:203-209.
- Grinsted, J., and R. W. Lacey** (1973). Ecological and genetic implications of pigmentation in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **75**:259-267.
- Gross, C. A.** (1996). Function and regulation of the heat shock proteins. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* (ed. F.C. Neidhardt, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasnik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger), pp. 1382-1399. ASM Press, Washington, D. C.

- Haga, K., P. Noirot, N.-G. M.-F., P. Mervelet, D. Y. Reyes, S. D. Ehrlich, and H. Yoshikawa (2001). Role for DnaK/J chaperone machinery in *Bacillus subtilis* class II stress regulation. *Functional Genomics of Gram-positive Bacteria*, San Diego, California.
- Haldenwang, W. G. (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*. **59**:1-30.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Biol.* **166**.
- Hanahan, D., J. Jesse, and F. R. Bloom (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, **204**:63.
- Hecker, M., and U. Volker (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **44**:35-91.
- Hengge-Aronis, R. (2000). The general stress response in *Escherichia coli*, p. 161-178. In G. Storz, and R. Hengge-Aronis (eds), *Bacterial stress responses*. ASM, Washington, D.C.
- Henkel, C. 2002. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg.
- Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkli, B. C. Li, and R. Herrmann (1996). Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*. **24**:4420-4449.
- Himmelreich, R., H. Plagens, H. Hilbert, B. Reiner, and R. Herrmann (1997). Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Research*. **25**:701-712.
- Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*. **3**:165-170.
- Hoffmann, T., J. Gade, U. Völker, and E. Bremer unveröffentlichte Daten.
- Homuth, G., S. Masuda, A. Mogk, Y. Kobayashi, and W. Schumann (1997). The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *J. Bacteriol.* **179**:1153-1164.
- Hoppe, T., K. Matuschewski, M. Rape, S. Schlenker, H. D. Ulrich, and S. Jentsch (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*. **102**:577-586.
- Hövel, S. (1998). Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg.  
<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/pimamal-compo.de>  
<http://www.Tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>
- IBA (1997). *Strep-tag Protein Expressions- und Reinigungssystem*, Manual, Göttingen.
- Jiang, W., Y. Hou, and M. Inouye (1997). CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is a RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* **272**:196-202.
- Jones, P. G., M. Mitta, Y. Kim, W. Jiang, and M. Inouye (1996). Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **93**:76-80.
- Kalman, S., M. L. Duncan, S. M. Thomas, and C. W. Price (1990). Similar organization of the *sigB* and *spoIIA* operons encoding alternate sigma factors of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **172**:5575-5585.
- Kaneda, T. (1991). Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* **55**:288-302.
- Kang, C. M., M. S. Brody, S. Akbar, X. F. Yang, and C. W. Price (1996). Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor SigB in response to environmental stress *J. Bacteriol.* **178**:3846-3853.
- King, N., O. Dreesen, P. Stragier, K. Pogliano, and R. Losick (1999). Septation, dephosphorylation and the activation of SigF during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **13**:1156-1167.
- Klein, W., M. H. W. Weber, and M. A. Marahiel (1999). Cold shock response of *Bacillus subtilis*: Isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J. Bacteriol.* **181**:5341-5349.
- Knobloch, J. K., K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, H. H. Feucht, and D. Mack (2001). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an

- activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress *J. Bacteriol.* **183**:2624-2633.
- Kormanec, J., D. Homerova, I. Barak, and B. Sevcikova** (1999). A new gene, *sigG*, encoding a putative alternative sigma factor of *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**:153-8.
- Kormanec, J., B. Sevcikova, N. Halgasova, R. Knirschova, and B. Rezuchova** (2000). Identification and transcriptional characterisation of the gene encoding the stress-response sigma factor SigH in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *FEMS Microbiol. Lett.* **189**:31-38.
- Kruger, E., D. Zuhlke, E. Witt, H. Ludwig, and M. Hecker** (2001). Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *Embo J.* **20**:852-863.
- Kullik, I., and P. Giachino** (1997). The alternative sigma factor SigB in *Staphylococcus aureus* - Regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. *Archives of Microbiology.* **167**:151-159.
- Kullik, I., P. Giachino, and T. Fuchs** (1998). Deletion of the alternative sigma factor SigB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J. Bacteriol.* **180**:4814-4820.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, and A. Danchin** (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390**:249-256.
- Kushner, S. R.** (1978). An improved method of transformation of *Escherichia coli* with ColEI derived plasmids, p. 17-23, *Genetic engineering*. Boyer, S. Nicosia, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Lee, H. M., E. Flores, K. Forchhammer, A. Herrero, and N. T. de Marsac** (2000). Phosphorylation of the signal transducer P-II protein and an additional effector are required for the P-II-mediated regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus sp* PCC 7942. *Eur. J. Biochem.* **267**:591-600.
- Lee, C. S., I. Lucet, and M. D. Yudkin** (2000). Fate of the SpoIIAB\*-ADP liberated after SpoIIAB phosphorylates SpoIIAA of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**:6250-6253.
- Lewis, P. J., T. Magnin, and J. Errington** (1996). Compartmentalized distribution of the proteins controlling the prespore-specific transcription factor SigF of *Bacillus subtilis*. *Genes to Cells.* **1**:881-894.
- Lewis, R.** (2001). Structural studies of the stress response of *Bacillus subtilis*. Functional Genomics of Gram-positive Bacteria, San Diego, California.
- Lord, M., D. Barilla, and M. D. Yudkin** (1999). Replacement of vegetative SigA by sporulation-specific SigF as a component of the RNA polymerase holoenzyme in sporulating *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:2346-2350.
- Lord, M., T. Magnin, and M. D. Yudkin** (1996). Protein conformational change and nucleotide binding involved in regulation of SigF in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**:6730-6735.
- Lou, Y., and A. E. Yousef** (1997). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1252-1255.
- Lucet, I., R. Borriss, and M. D. Yudkin** (1999). Purification, kinetic properties, and intracellular concentration of SpoIIE, an integral membrane protein that regulates sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:3242-3245.
- Magnin, T., M. Lord, and M. D. Yudkin** (1997). Contribution of partner switching and SpoIIAA cycling to regulation of SigF activity in sporulating *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**:3922-3927.

- Maul, B., U. Völker, S. Riethdorf, S. Engelmann, and M. Hecker** (1995). SigB-dependent regulation of *gsiB* in response to multiple stimuli in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genetics*. **248**:114-120.
- Min, K. T., C. M. Hilditch, B. Diederich, J. Errington, and M. D. Yudkin** (1993). SigF, the first compartment-specific transcription factor of *Bacillus subtilis*, is regulated by an anti-sigma factor that is also a protein kinase. *Cell*. **74**:735-742.
- Mogk, A., A. Volker, S. Engelmann, M. Hecker, W. Schumann, and U. Völker** (1998). Nonnative proteins induce expression of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon. *J. Bacteriol.* **180**:2895-2900.
- Morita, M., M. Kanemori, H. Yanagi, and T. Yura** (1999). Heat-induced synthesis of Sig32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure. *J. Bacteriol.* **181**:401-410.
- Najafi, S. M. A., D. A. Harris, and M. D. Yudkin** (1997). Properties of the phosphorylation reaction catalyzed by SpoIIAB that help to regulate sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**:5628-5631.
- Odriscoll, B., C. G. M. Gahan, and C. Hill** (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes* - Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1693-1698.
- Ollis, D.L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra., F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J. Schrag et al.** (1992). The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**:197-211.
- Pan, Q., D. A. Garsin, and R. Losick** (2001). Self-reinforcing activation of a cell-specific transcription factor by proteolysis of an anti-sigma factor in *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell*. **8**:873-883.
- Persuh, M., K. Turgay, I. Mandic-Mulec, and D. Dubnau** (1999). The N- and C-terminal domains of MecA recognize different partners in the competence molecular switch. *Mol. Microbiol.* **33**:886-94.
- Petersohn, A., H. Antelmann, U. Gerth, and M. Hecker** (1999 a). Identification and transcriptional analysis of new members of the SigB regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* **145**:869-880.
- Petersohn, A., J. Bernhardt, U. Gerth, D. Höper, T. Koburger, U. Völker, and M. Hecker** (1999 b). Identification of SigB-dependent genes in *Bacillus subtilis* using a promoter consensus-directed search and oligonucleotide hybridization. *J. Bacteriol.* **181**:5718-5724.
- Petersohn, A., S. Engelmann, P. Setlow, and M. Hecker** (1999 c). The *katX* gene of *Bacillus subtilis* is under dual control of SigB and SigF. *Mol Gen Genet.* **262**:173-179.
- Phadtare, S., K. Yamanaka, and M. Inouye** (2000). The cold shock response., p. 33-47. In G. Storz, and R. Hengge-Aronis (eds), *Bacterial stress responses*. ASM, Washington, D.C.
- Price, C. W.** (2002). General stress response. In Sonenshein (ed.).
- Price, C. W.** (2000). Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria., p. 179-197. In G. Storz, and R. Hengge-Aronis (eds), *Bacterial stress responses*. ASM, Washington, D.C.
- Price, C. W., P. Fawcett, H. Ceremonie, N. Su, C. K. Murphy, and P. Youngman** (2001). Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **41**:757-774
- Rachid, S., K. Ohlsen, U. Wallner, J. Hacker, M. Hecker, and W. Ziebuhr** (2000). Alternative transcription factor SigB is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J. Bacteriol.* **182**:6824-6826.
- Redfield, A. R., and C. W. Price** (1996). General stress transcription factor SigB of *Bacillus subtilis* is a stable protein. *J. Bacteriol.* **178**:3668-3670.
- Rocourt, J., and P. Cossart.** (1997). *Listeria monocytogenes*, p. 337-352. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.), *Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Sambrook, J., J. Fritsch, and T. Maniatis** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual., 2nd edition, New York: Cold Spring Harbour Laboratory.

- Schindelin, H., M. A. Marahiel, and U. Heinemann** (1993). Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *Bacillus subtilis* major cold-shock protein. *Nature*. **364**:164-168.
- Schmidt, R., P. Margolis, L. Duncan, R. Coppolecchia, C. P. Moran, Jr., and R. Losick** (1990). Control of developmental transcription factor SigF by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**:9221-9225.
- Schnuchel, A., R. Wiltschek, M. Czisch, M. Herrler, G. Willmsky, P. Graumann, M. A. Marahiel, and T. A. Holak** (1993). Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nature*. **364**:169-171.
- Schroder, K., P. Graumann, A. Schnuchel, T. A. Holak, and M. A. Marahiel** (1995). Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Mol Microbiol*. **16**:699-708.
- Schütz, A., and U. Völker** (1998). Protokoll: Silberfärbung für zweidimensionale Gele.
- Scott, J. M., and W. G. Haldenwang** (1999). Obg, an essential GTP binding protein of *Bacillus subtilis*, is necessary for stress activation of transcription factor SigB. *J. Bacteriol*. **181**:4653-4660.
- Scott, J. M., J. L. Ju, T. Mitchell, and W. G. Haldenwang** (2000). The *Bacillus subtilis* GTP binding protein Obg and regulators of the SigB stress response transcription factor cofractionate with ribosomes. *J. Bacteriol*. **182**:2771-2777.
- Seavers, R. P., R. Lewis, K. H. G. Verschuere, G. N. Murshudov, A. J. Wilkinson, and J. A. Brannigan** (2001). Comparative genomics in Structural Biology: Structure of the *Bacillus* cell fate determinant SpoIIAA in phosphorylated and non-phosphorylated forms. Functional Genomics of Gram-positive Bacteria, San Diego, California.
- Smirnova, N., J. Scott, U. Völker, and W. Haldenwang** (1998). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* sigB operon mutations that suppress the loss of the negative regulator RsbX. *J. Bacteriol*. **180**:3671-3680.
- Suzuki, I., D. A. Los, Y. Kanesaki, K. Mikami, and N. Murata** (2000). The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO J*. **19**:1327-1334.
- Taylor, B. L., and I. B. Zhulin** (1999). PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential Trach, K., and J. A. Hoch 1989. The *Bacillus subtilis* spo0B stage 0 sporulation operon encodes an essential GTP-binding protein. *J. Bacteriol*. **171**:1362-1371.
- and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:479-506.
- Van Boglelen, R. A. and F.C. Neidhard** (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**:5589-5593
- Vidwans, S. J., K. Ireton, and A. D. Grossman** (1995). Possible role for the essential GTP-binding protein Obg in regulating the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. **177**:3308-3311.
- Vigh, L., B. Maresca, and J. L. Harwood** (1998). Does the membranes physical state control the expression of heat shock and other genes. *Trends in Biochemical Sciences*. **23**:369-374.
- Vijay, K., M. S. Brody, E. Fredlund, and C. W. Price** (2000). A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the SigB transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*. **35**:180-188.
- Völker, A.** (1999). Dissertation. Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.
- Völker, U., K. K. Andersen, H. Antelmann, K. M. Devine, and M. Hecker** (1998). There are two homologues of OsmC in *Bacillus subtilis*, one of which (ykzA) is part of the SigB-dependent general stress regulon. *J. Bacteriol*. **180**:4212-4218.
- Völker, U., A. Dufour, and W. G. Haldenwang** (1995 a). The *Bacillus subtilis* rsbU gene product is necessary for RsbX-dependent regulation of SigB. *J. Bacteriol*. **177**:114-122.

- Völker, U., S. Engelmann, B. Maul, S. Riethdorf, A. Völker, R. Schmid, H. Mach, and M. Hecker** 1994. Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* **140**:741-752.
- Völker, U., T. Q. Luo, N. Smirnova, and W. Haldenwang** (1997). Stress activation of *Bacillus subtilis* SigB can occur in the absence of the SigB negative regulator RsbX. *J. Bacteriol.* **179**:1980-1984.
- Völker, U., A. Völker, and W. G. Haldenwang** (1996). Reactivation of the *Bacillus subtilis* anti-SigB antagonist, RsbV, by stress- or starvation-induced phosphatase activities. *J. Bacteriol.* **178**:5456-5463.
- Völker, U., A. Völker, B. Maul, M. Hecker, A. Dufour, and W. G. Haldenwang** (1995 b). Separate mechanisms activate SigB of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J. Bacteriol.* **177**:3771-3780.
- Volker, U., B. Maul, and M. Hecker** (1999). Expression of SigB-dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:3942-3948.
- Wassenberg, D., W. Liebl, and R. Jaenicke** (2000). Maltose-binding protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: stability and binding properties. *J. Mol. Biol.* **295**:279-288.
- Weber, M. H., W. Klein, L. Muller, U. M. Niess, and M. A. Marahiel** (2001). Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol. Microbiol.* **39**:1321-1329.
- Welsh, K. M., K. A. Trach, C. Folger, and J. A. Hoch** (1994). Biochemical characterization of the essential GTP-binding protein Obg of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**:7161-7168.
- White, B. A.** 1993. PCR Protokolls. Humana Press, Totwa, NJ.
- Wiedmann, M., T. J. Arvik, R. J. Hurley, and K. J. Boor** (1998). General stress transcription factor SigB and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **180**:3650-3656.
- Wise, A. A., and C. W. Price** (1995). Four additional genes in the *sigB* operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor SigB in response to environmental signals. *J. Bacteriol.* **177**:123-133.
- Wu, L., and J. Errington** (1998). Use of asymmetric cell division and *spolIE* mutants to probe chromosome orientation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **27**:777-786.
- Wu, L. J., and J. Errington** (1994). *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science*. **264**:572-575.
- Wu, S. W., H. Delencastre, and A. Tomasz** (1996). SigB, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymeras - Molecular cloning and DNA sequencing. *J. Bacteriol.* **178**:6036-6042.
- Yamanaka, K., L. Fang, and M. Inouye** (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol. Microbiol.* **27**:247-255.
- Yang, X. F., C. M. Kang, M. S. Brody, and C. W. Price** (1996). Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev.* **10**:2265-2275.
- Yura, T., M. Kanemori, and M. T. Morita** (2000). The heat shock response: Regulation and function, p. 3-18. In G. Storz, and R. Hengge-Aronis (eds), *Bacterial stress responses*. ASM, Washington, D.C.



## 7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Uwe Völker für die interessante Themenstellung, die stetige Diskussionsbereitschaft und Förderung in jeglicher Hinsicht.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Alexandra Schütz danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der 2D-Gele.

Den Arbeitsgruppen Bremer und Buckel danke ich für die Hilfe bei der Bewältigung der zahlreichen Probleme des Laboralltags.

Ganz besonders möchte ich Antonio Pierik für seine kompetente Unterstützung bei den Fluoreszenzstudien und den Proteinreinigungen danken.

Georg Homuth danke ich für die Überlassung von Stämmen.

Milton Stubbs danke ich sehr für die Hilfestellung bei den Kristallisationsansätzen.

Der größte Dank gilt meinem Mann Andreas, der mich immer unterstützt hat.

## 8 Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Andrea Krisp, geb. Reißmann
Geboren	14.06.73
Familienstand	Verheiratet mit Dr. med. Andreas Krisp seit dem 26.05.00
Eltern	Carola Reißmann, geb. Kunze Rüdiger Reißmann

### Bildungsweg

06.05.1993	Abitur an der „Grossen Schule“, Wolfenbüttel, Niedersachsen
20.10.1993	Aufnahme des Diplomstudienganges Biologie, TU Carolo-Wilhelmina Braunschweig, Niedersachsen
27.07.1995	Abschluss des Grundstudiums mit dem Vordiplom der Note „sehr gut“ Fächer: Mikrobiologie, Zoologie, Botanik, Organische Chemie und Physik
20.10.1995	Zum Hauptstudium: Wechsel an die Philipps-Universität: Schwerpunkt Mikrobiologie:
23.10.1997	Ablegen der Diplomprüfung mit „sehr gut“ Fächer: Mikrobiologie, Biochemie, Virologie, Genetik
01.11.1997- 01.10.1998	Anfertigung der praktischen Arbeit über die „Regulation des Sigmafaktors B aus <i>Bacillus subtilis</i> “ im Laboratorium von PD Dr. U. Völker, im Bereich von Prof. Dr. R. Thauer an der Philipps-Universität Marburg und am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie Marburg
01.11.1998- Juli, 2002	Fortführung dieser Arbeit in der Dissertation im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg und im Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie Marburg im Laboratorium von PD Dr. U. Völker/ Bereich Prof. Dr. R. Thauer Abschluss mit „sehr gut“
1999-2000	Stipendiat im DFG geförderten Sonderforschungsbereich „SFB 395 Bodenmikroorganismen“
1999-2002	Mitglied im Graduiertenkolleg „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“
Seit Mai 2002	Leiterin des Koordinationszentrums Mitte (Marburg), Kompetenzwerk Parkinson, Klinik für Neurologie, Philipps-Universität Marburg

## 9 Selbstständigkeitserklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation „Analyse der Induktion der generellen Stressantwort von *Bacillus subtilis* während des Wachstums bei niedriger Temperatur – Charakterisierung der Interaktionen von RsbW mit SigB und RsbV“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch an keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort/Datum)

---

(Unterschrift mit Vor-und Zuname)